

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE INDIVIDUOS
CON EXPOSICIÓN SEXUAL PERSISTENTE AL VIRUS DE
LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) QUE
PERMANECEN SERONEGATIVOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Clara Restrepo González

Bajo la dirección de los doctores

José Miguel Benito Huete
Norma Ibón Rallón Afanador
Vicente Soriano Vázquez

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I

**Caracterización inmunológica de individuos con
exposición sexual persistente al virus de la
inmunodeficiencia humana (VIH) que permanecen
seronegativos**

TESIS DOCTORAL

Clara Restrepo González

Madrid, 2012

Tesis Doctoral

Caracterización inmunológica de individuos con exposición sexual persistente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que permanecen seronegativos

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad Complutense de Madrid por la licenciada:

Clara Restrepo González

Directores de Tesis:

Dr. José Miguel Benito Huete

Doctor en Medicina. Responsable del Área de Inmunología. Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III, Madrid.

Dra. Norma Ibón Rallón Afanador

Doctora en Inmunología. Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III, Madrid.

Dr. Vicente Soriano Vázquez

Doctor en Medicina. Jefe de Sección. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III, Madrid

VºBº de los Directores de la Tesis:

Índice

1. Resumen	2
2. Introducción	3
2.1. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	4
2.1.1. Estructura	5
2.1.2. Ciclo replicativo	7
2.1.3. Historia natural de la infección	9
2.2. Respuesta inmunológica frente al VIH	11
2.2.1. Innata	11
2.2.2. Adaptativa	13
2.2.2.1. Humoral	13
2.2.2.2. Celular	14
2.3. Sujetos expuestos al VIH que permanecen seronegativos (HESN)	16
2.4. Factores del huésped involucrados en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en individuos HESN	18
2.4.1. Factores Genéticos	18
2.4.1.1. HLA y KIR	18
2.4.1.2. Quimiocinas y sus ligandos	21
2.4.1.3. Otros factores genéticos	24
2.4.2. Factores inmunológicos	24
2.4.2.1. Inmunidad Innata	24
2.4.2.2. Inmunidad Adquirida	28
2.4.2.2.1. Respuesta Inmunológica Humoral	28
2.4.2.2.2. Respuesta Inmunológica Celular	29
2.4.2.3. Células T doble negativas	33
2.4.2.4. Alteraciones en el estado de maduración y activación de células T CD4+ y CD8+	34

2.5. Justificación del estudio.....	36
3. Objetivos.....	38
4. Pacientes y Métodos.....	41
4.1. Población de estudio.....	41
4.2. Determinación de parámetros de laboratorio.....	44
4.3. Obtención de plasma y células mononucleares de sangre periférica (CMSP)....	45
4.4. Extracción de ácidos nucleicos.....	45
4.5. Péptidos solapantes del VIH.....	46
4.6. Ensayo de producción intracelular de citoquinas por las células T CD4+ y CD8+.....	47
4.6.1. Cultivo <i>in vitro</i> . Estimulación de CMSP.....	47
4.6.2. Tinción para citometría de flujo.....	50
4.6.3. Análisis por citometría de flujo multiparamétrica.....	50
4.7. Parámetros de respuesta inmunológica de las células T CD4+ y CD8+.....	53
4.8. Análisis fenotípico de las células T doble negativas (DN) (CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻).....	54
4.9. Ensayo de producción intracelular de citoquinas por las células T DN.....	54
4.10. Análisis del estado de maduración y activación de células T CD4+ y CD8+.....	59
4.11. Caracterización de la respuesta humoral específica frente al VIH.....	61
4.11.1. Líneas celulares.....	61
4.11.2. Detección de anticuerpos neutralizantes.....	61
4.11.3. Detección de anticuerpos frente a la envuelta viral.....	63
4.11.4. Reactividad frente a moléculas de la membrana celular (CD4, CCR5 y CXCR4) involucradas en la entrada del VIH.....	64
4.12. Determinación de alelos HLA clase I y HLA clase II.....	65
4.13. Determinación de genes KIR.....	66

4.14. Determinación del polimorfismo rs12979860 cercano al gen de la interleuquina 28B (<i>IL28B</i>).....	67
4.15. Análisis estadístico.....	68
5. Resultados.....	69
5.1. Características de la población estudiada.....	70
5.2. Características de la respuesta inmunológica específica frente al VIH, mediada por las células T CD4+ y CD8+.....	72
5.2.1. Prevalencia, intensidad y amplitud de la respuesta inmunológica específica de las células T CD4+ y CD8+ frente al VIH.....	73
5.2.2. Perfil funcional de la respuesta inmunológica específica de las células T CD4+ y CD8+ frente al VIH.....	76
5.3. Características de la respuesta inmunológica mediada por las células T doble negativas (DN) (CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻).....	78
5.3.1. Frecuencia de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$	79
5.3.2. Características de la respuesta de las células T DN frente a un estímulo policlonal.....	80
5.3.3. Características de la respuesta específica de las células T DN frente a la proteína Gag del VIH.....	84
5.3.4. Perfil funcional de la respuesta de células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$ específicas frente a Gag.....	85
5.4. Estado de maduración y activación de las células T CD4+ y CD8+.....	86
5.5. Características de la respuesta humoral específica frente al VIH.....	90
5.5.1. Actividad neutralizante.....	90
5.5.2. Reconocimiento de la envuelta viral.....	91

5.5.3. Reconocimiento de moléculas de la membrana celular (CD4, CCR5, CXCR4) involucradas en la entrada del VIH.....	97
5.6. Distribución de los alelos HLA clase I y clase II y de los genes KIR.....	98
5.6.1. Prevalencia de supertipos y alelos de HLA clase I y clase II.....	99
5.6.2. Asociación de los supertipos y alelos de HLA clase I y clase II con el estatus HESN.....	101
5.6.3. Frecuencia de genes KIR.....	102
5.7. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs12979860 cercano al gen de la <i>IL28B</i>	104
6. Discusión.....	105
6.1. Respuesta específica frente al VIH mediada por células T CD4+ y CD8+.....	106
6.2. Respuesta mediada por las células T DN (CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻).....	110
6.3. Estado de maduración y activación de las células T CD4+ y CD8+.....	114
6.4. Características de la respuesta humoral específica frente al VIH.....	115
6.5. Distribución de los alelos HLA clase I y clase II y de los genes KIR.....	119
6.6. Papel del polimorfismo rs2979860 cercano al gen de la <i>IL28B</i> en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en sujetos HESN.....	121
7. Conclusiones.....	124
8. Bibliografía.....	127
9. Publicaciones surgidas durante esta tesis.....	141
10. Abreviaturas.....	144

1. Resumen

Existen individuos que a pesar de repetidas exposiciones al VIH permanecen seronegativos, sin evidencia clínica ni virológica de infección por este virus. A estos individuos se les conoce como “expuestos al VIH que permanecen seronegativos” (HESN; del inglés “HIV-exposed but seronegative”). Dentro de este grupo de sujetos se han descrito trabajadoras sexuales, recién nacidos de madres infectadas, usuarios de drogas intravenosas, trabajadores sanitarios, y parejas homosexuales o heterosexuales de individuos infectados por el VIH. Los individuos HESN representan un modelo muy interesante para el estudio de factores del huésped potencialmente asociados con la protección frente a la infección por el VIH.

En este trabajo se investigan de manera simultánea, diferentes factores inmunológicos y genéticos que podrían dar cuenta de la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en los individuos HESN. Entre los factores inmunológicos se analizan: a) Las características cuantitativas y cualitativas de la respuesta específica frente al VIH mediada por las células T CD4⁺ y CD8⁺, así como por las células T doble negativas (CD3⁺CD4⁻CD8⁻); b) El estado de maduración y activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺; y c) La presencia de respuesta humoral específica frente al VIH, midiendo la actividad neutralizante y la reactividad de anticuerpos frente a las glicoproteínas de la envuelta del VIH. Se analizan también factores genéticos, como la frecuencia de diversos alelos y supertipos del HLA clase I y clase II; y la distribución de genes, genotipos y haplotipos KIR. Por último, se analiza si existe asociación entre el polimorfismo rs12979860 cercano al gen de la interleuquina 28B (IL28B) y la baja susceptibilidad a la infección por el VIH.

Los resultados de este trabajo muestran que los individuos HESN son capaces de desplegar una respuesta inmunológica celular específica frente al VIH mediada por células T CD4⁺ y CD8⁺ y por células T doble negativas. Además, se observó la presencia de actividad neutralizante y de anticuerpos IgG e IgA con reactividad específica frente a la envuelta del VIH. Esto demuestra que la exposición sexual al VIH en los individuos HESN puede inducir una respuesta inmunológica de tipo celular y humoral específica frente al virus. Estos sujetos mostraron niveles elevados de activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺, lo cual puede ser también una consecuencia más de la exposición al virus. Probablemente, la suma de todos estos factores inmunológicos, además de sugerir una verdadera exposición al VIH, podría estar favoreciendo la baja susceptibilidad a la infección en los sujetos HESN.

En cuanto a los factores genéticos, ser portador del alelo HLA-DQB1*03:02 se asoció con un incremento en la probabilidad de presentar el estatus HESN, mientras que la presencia del alelo HLA-A*02:01 se asoció con una disminución en la probabilidad de presentar el estatus HESN. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la distribución de genes y haplotipos KIR al comparar sujetos HESN y pacientes VIH⁺. Finalmente, el genotipo protector (CC) del polimorfismo rs2979860 cercano al gen de la IL28B fue más frecuente en los individuos HESN que en sus parejas VIH⁺, aunque no alcanzó significación estadística.

2. Introducción

2.1. El virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en humanos. Es un virus ARN clasificado dentro de la familia *Retroviridae* perteneciente al género *Lentivirus* ([Barre-Sinoussi et al., 1983](#)). Infecta principalmente a los linfocitos T CD4+ en los que se replica con una cinética muy rápida.

Se han identificado dos tipos: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el más extendido y es responsable de la mayor parte de los casos de infección por VIH en el mundo. Mientras que el VIH-2 parece ser menos patógeno y menos transmisible. Dentro del VIH-1, diversos análisis filogenéticos de aislados virales de distintas procedencias geográficas han llevado a clasificar el VIH en tres grandes grupos: grupo M (del inglés *main* o principal), grupo O (del inglés *outlier* o atípico) y grupo N (no M, no O) y el grupo P descrito recientemente ([Plantier et al., 2009](#)). La mayoría de cepas circulantes en el mundo pertenecen al grupo M y el resto de grupos se encuentran limitados principalmente a África subsahariana occidental. El grupo M, responsable de más del 97% de todas las infecciones a nivel mundial, comprende varios subtipos denominados por las letras A, B, C, D, F, G, H, J y K, y formas recombinantes denominadas CRF (formas recombinantes circulantes). Los subtipos no B son los responsables del 95% de las infecciones en el mundo. Sin embargo, el subtipo B es el más predominante en Europa y América del Norte ([UNAIDS, 2008](#)).

2.1.1. Estructura del VIH

El VIH está constituido por una envuelta externa (bicapa lipídica) en la cual se insertan la glicoproteína de superficie gp120 y la proteína transmembrana gp41. Esta envuelta porta además diversas proteínas celulares arrastradas por el virus en el proceso de gemación y que le permite al virus tener mayor infectividad. En el interior de la bicapa lipídica se encuentran las proteínas de la matriz (p17), cápside (p24) y nucleocápside (p7). Dentro de la cápside viral, se localiza el material genético del virus constituido por dos cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9,8 kb asociadas a las proteínas de la nucleocápside, enzimas esenciales para la replicación del virus (transcriptasa inversa TI, proteasa PR e integrasa IN) y las proteínas reguladoras y accesorias (Emerman y Malim, 1998; Seelamgari *et al.*, 2004). (Figura 1).

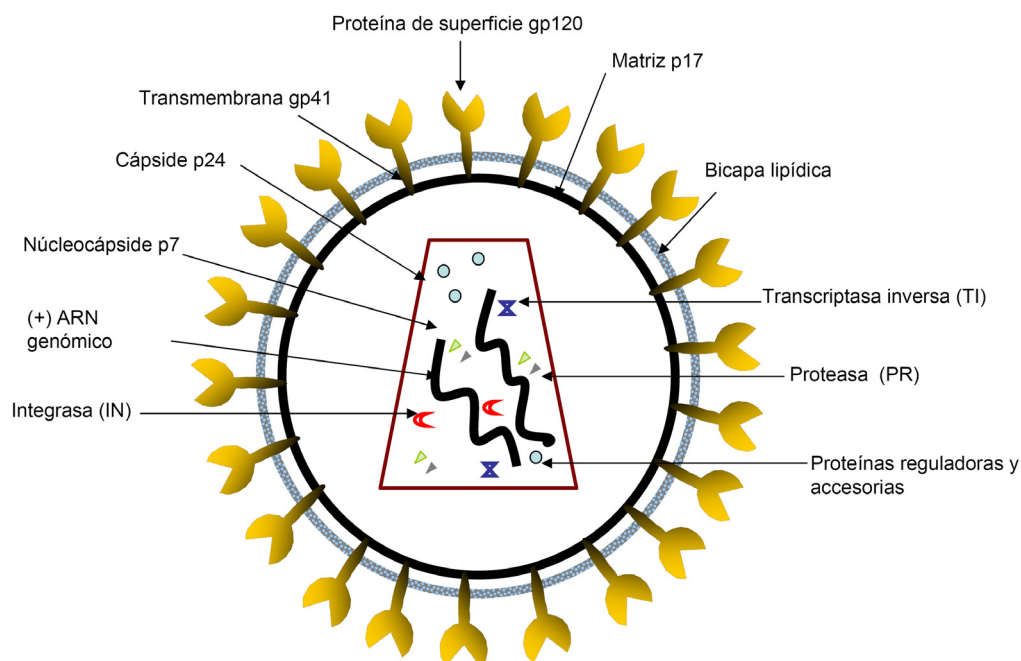


Figura 1. Esquema de la estructura del VIH

El genoma del VIH posee una longitud aproximada de 9,8 kb. Está formado por tres genes esenciales: *gag* y *env*, que codifican las proteínas estructurales y *pol* que codifica para las enzimas virales esenciales para el ciclo replicativo viral, y 6 genes que codifican para las proteínas reguladoras (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr, Vpu). Las secuencias repetidas largas (LTR, del inglés *long terminal repeats*), no codificantes, flanquean los extremos 3' y 5' del genoma viral, donde se encuentran regiones reguladoras esenciales para el ciclo replicativo del virus (**Figura 2 y Tabla 1**).

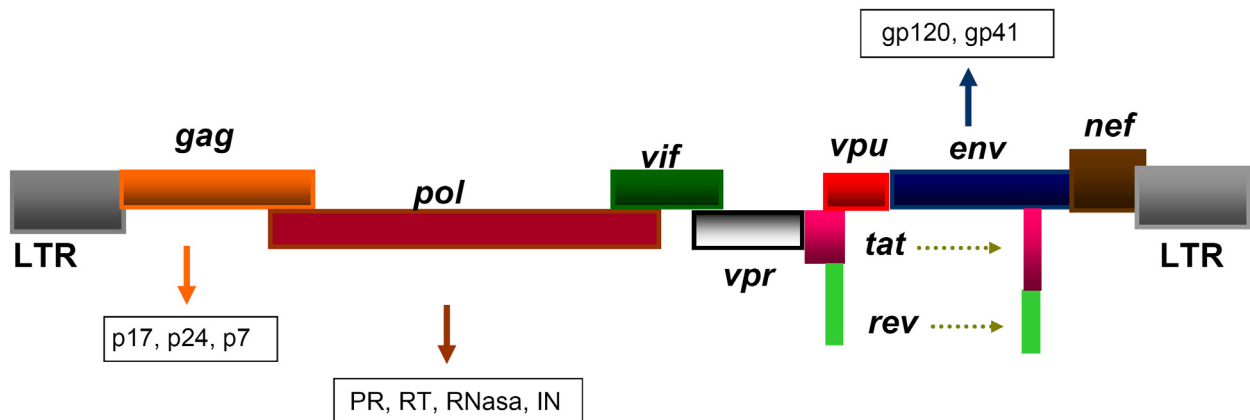


Figura 2. Organización del genoma del VIH

Tabla 1. Función de las proteínas del VIH**Tabla 1.** Función de las proteínas del VIH

Genes	Proteína	Función
Estructurales		
<i>gag</i>	p17	Proteína que forma la matriz.
	p24	Proteína que forma la cápside.
	p7	Proteína de la nucleocápside. Implicada en la liberación de la progenie viral.
<i>pol</i>	PR	Enzima proteasa. Interviene en el procesamiento postrasduccional de las poliproteínas Gag y Gag-Pol.
	TI	Enzima transcriptasa inversa. Cataliza el paso de ARN a ADN.
	IN	Enzima integrasa. Implicada en la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped.
<i>env</i>	gp120	Glicoproteína de superficie que forma la envuelta. Interacciona con el receptor CD4 de la célula huésped.
	gp41	Glicoproteína de superficie implicada en la fusión de membranas.
Reguladores		
<i>tat</i>	Tat	Factor transactivador de la transcripción viral.
<i>rev</i>	Rev	Regula el transporte del núcleo al citoplasma y procesamiento de los RNA mensajeros virales.
Accesorios		
<i>nef</i>	Nef	Aumenta la infectividad. Regula negativamente el receptor CD4 y las moléculas HLA clase I.
<i>vif</i>	Vif	Factor de infectividad viral. Inhibe la acción de la proteína celular APOBEC.
<i>vpr</i>	Vpr	Proteína implicada en el transporte del complejo de preintegración del citoplasma al núcleo, en la transactivación de genes del huésped y en la parada del ciclo celular.
<i>vpu</i>	Vpu	Promueve la liberación de viriones de la célula. Implicada en el bloqueo de CD4 en el retículo endoplasmático para evitar la interacción prematura con la gp120 sintetizada. Bloquea la función de la teterina celular.

2.1.2. Ciclo replicativo del VIH

La replicación del VIH se puede dividir en las siguientes etapas: 1) Interacción del virus con la célula diana (linfocitos T CD4+ principalmente) por medio de la unión de la glicoproteína gp120 con el receptor CD4. Aquí intervienen también otras proteínas de membrana celulares (CCR5 o CXCR4 mayoritariamente), cuya función fisiológica es la de ser receptores de quimiocinas pero que actúan como co-receptores del virus en la infección; 2) Fusión de la membrana viral y celular; 3) Liberación al citoplasma del contenido de la cápside viral; 4) Transcripción inversa del ARN genómico viral y formación del ADN complementario de doble cadena; 5) Transporte del ADN al núcleo celular; 6) Integración en el genoma de la célula hospedadora mediante las

secuencias LTR; 7) Transcripción de los genes provirales utilizando tanto factores celulares como virales que se van a unir a la región LTR presente en ambos extremos del provirus integrado; 8) Procesamiento de los transcritos primarios hasta ARN genómico viral y ARN mensajero viral. Traducción de los ARN mensajeros a las distintas proteínas virales en el citoplasma; 9) Ensamblaje de las proteínas virales; 10) Salida del virión por gemación, arrastrando parte de la membrana de la célula huésped. 11) Maduración por medio de la acción de la proteasa viral que corta las poliproteínas precursoras para formar el virión infectivo ([Levy, 1993](#)) (**Figura 3**). Las características del ciclo infectivo del VIH muestran varios puntos clave para bloquear la replicación del virus, por lo cual han sido elegidos para el diseño de fármacos antirretrovirales. Las enzimas fundamentales que intervienen en el ciclo viral son la transcriptasa inversa y la proteasa por lo que desde el primer momento se eligieron como dianas moleculares idóneas para la terapia antirretroviral. A las familias de fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa y proteasa, ampliamente utilizados en la actualidad, les han seguido las de los fármacos inhibidores de la entrada, los inhibidores de la integrasa y los antagonistas del co-receptor CCR5. Con ello, se dispone de un gran arsenal terapéutico de antirretrovirales con los que se trata la enfermedad en lo que se conoce como terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA).

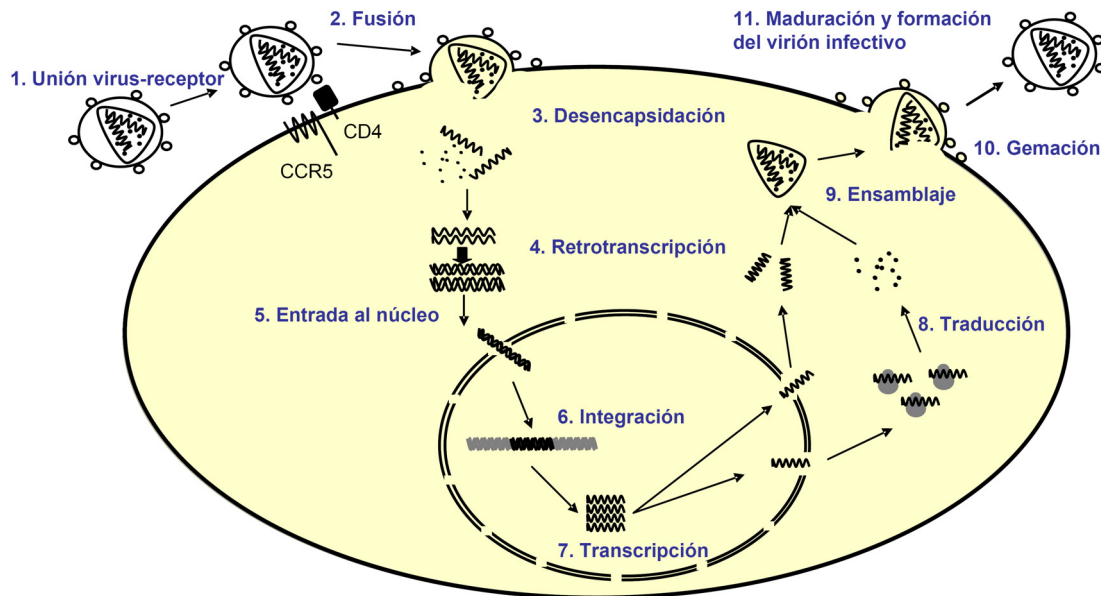


Figura 3. Ciclo replicativo del VIH

2.1.3. Historia Natural de la infección por el VIH

La infección por el VIH es una infección viral persistente que causa replicación viral y enfermedad crónica en el 100% de los casos. La infección por el VIH se presenta en diferentes fases: En una primera fase denominada infección aguda o primoinfección (sintomática o asintomática), la concentración de virus libre circulante es muy elevada y hay una disminución del número de linfocitos T CD4⁺ ([Pantaleo *et al.*, 1993](#)). Una vez resuelto este periodo de entre 2-6 semanas, y coincidiendo con la aparición de la inmunidad humoral y celular, la carga viral disminuye hasta alcanzar un valor que se mantendrá estable durante la mayor parte del curso de la infección. Durante la segunda fase, denominada infección crónica, generalmente se produce una disminución paulatina del número de linfocitos T CD4⁺. Finalmente, en la fase de infección avanzada, la cifra de linfocitos T CD4⁺ es muy baja y hay un incremento de la viremia circulante y es entonces cuando el paciente infectado puede desarrollar las

infecciones oportunistas y otras patologías que definen el SIDA (**Figura 4**). Actualmente, mediante la administración del tratamiento antirretroviral se ha conseguido alargar la fase crónica evitando llegar a la fase de SIDA. Las últimas guías de tratamiento proponen la administración de TARGA cuando existan niveles de células T CD4+ por debajo de 350 células/ μ L o aparezcan síntomas definitorios de SIDA ([Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents., 2011](#)).

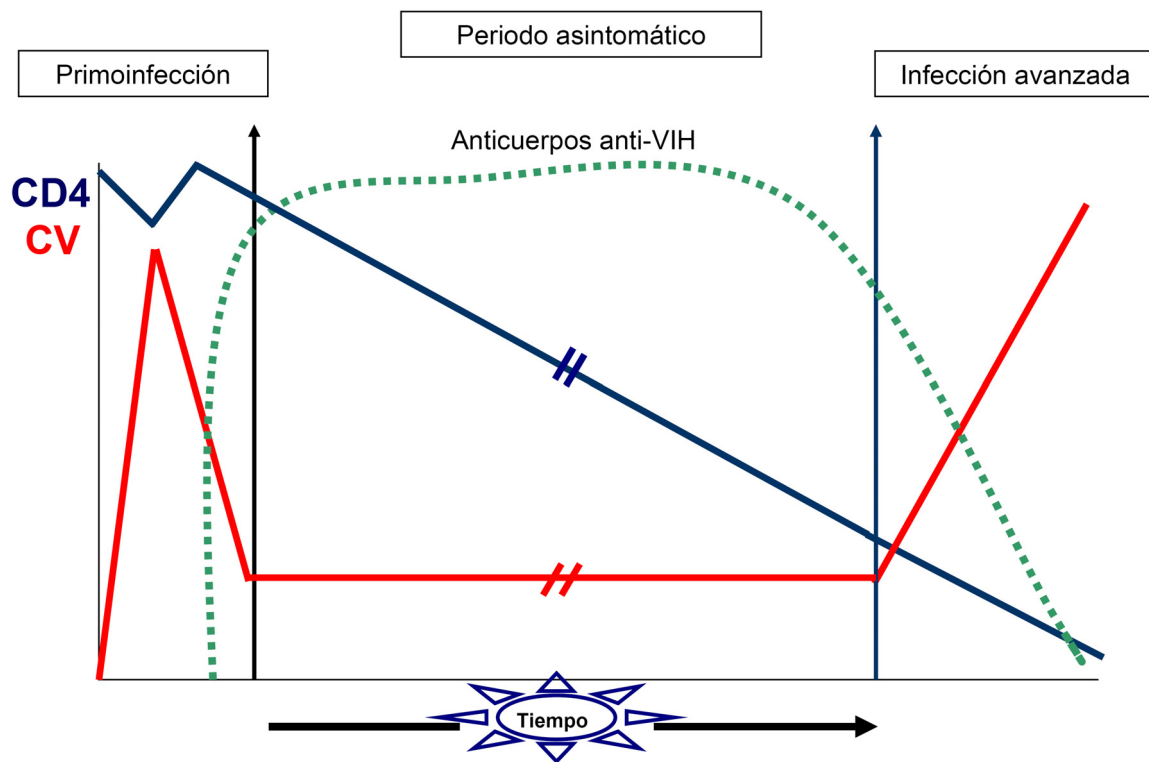


Figura 4. Historia natural de la infección por el VIH

2.2. Respuesta inmunológica frente al VIH

2.2.1. Respuesta Inmunológica Innata

La primera barrera de defensa del huésped ante cualquier infección es la respuesta inmunológica innata. Es una respuesta inmediata e inespecífica que permite limitar la replicación y diseminación de patógenos, dando tiempo a la respuesta inmunológica adaptativa para generar una respuesta protectora específica del patógeno en cuestión.

Específicamente en infecciones virales, diferentes factores solubles como la MBL (del inglés, *manose-binding lectin*) y el complemento, pueden lisar directamente los virus o estimular su fagocitosis (Levy *et al.*, 2003). Las quimiocinas CCL3 ó MIP1 α (del inglés *macrophage inflammatory protein 1 alpha*), CCL4 ó MIP1 β y CCL5 ó RANTES (del inglés, *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*), pueden reclutar células NK (del inglés, *natural killer*), células T y macrófagos a los sitios de infección viral y aumentar la capacidad citotóxica de estas células (Biron *et al.*, 1999), además de competir por el co-receptor CCR5 bloqueando la entrada del VIH en la célula (Cocchi *et al.*, 1995). La producción de interferones tipo I (IFN-I), IFN α ó IFN β por células dendríticas y macrófagos es otro de los mecanismos de la respuesta inmunológica innata frente a las infecciones virales con importantes efectos inmunomoduladores (Biron, 2001). Estas moléculas pueden aumentar el reconocimiento del VIH a través de la respuesta inmunológica adquirida e inducir la producción de IFN γ por las células T CD4 $^{+}$ (Brinkmann *et al.*, 1993).

En la infección por el VIH, las defensinas, moléculas proteicas producidas principalmente por células epiteliales y del sistema inmunológico, contribuyen en la protección frente al virus a nivel de mucosas como parte de la inmunidad innata (Lehner *et al.*, 2008). Las defensinas pueden producirse de forma constitutiva o en respuesta a productos antigénicos o citoquinas pro-inflamatorias (Yang *et al.*, 2002).

Las células NK junto a los IFN-I, pueden eliminar directamente las células infectadas por el VIH o a través de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Biron *et al.*, 1999). Durante la infección aguda, las células NK junto con las NKT (células T natural killer), se activan y tienen la capacidad de controlar la replicación viral mediante citólisis de las células infectadas. También interactúan con las células dendríticas, influyendo de este modo en la respuesta de las células T.

Entre los numerosos receptores de las células NK, los llamados KIR (del inglés, *killer immunoglobuline-like receptor*) tienen como función el reconocimiento e interacción con moléculas del sistema antígeno leucocitario humano (HLA) (del inglés, *human leukocyte antigen*) clase I, y la interacción entre ambos resulta en la activación o inhibición de los mecanismos efectores de las células NK sobre la célula diana, siendo fundamental esta interacción para regular la funcionalidad de las células NK. Los genes KIR se segregan en haplotipos conformados por la presencia o ausencia de genes que codifican para los diferentes receptores con propiedades inhibitoras o activadoras de la función de la célula NK (Yawata *et al.*, 2006). El haplotipo A contiene principalmente genes KIR inhibidores y un solo gen activador, mientras que el haplotipo B tiene principalmente genes KIR activadores (Middleton *et al.*, 2005).

Las células $T_{\gamma\delta}$ (células cuyo TCR está formado por cadenas γ y δ) son otro componente importante de la respuesta inmunológica innata. Se encuentran principalmente a nivel de mucosas y producen citoquinas tanto de tipo Th1 (del inglés, *T-helper*) como Th2, al igual que quimiocinas RANTES, MIP1 α y MIP1 β en respuesta a antígenos no peptídicos (Poccia *et al.*, 2002). Estas células $T_{\gamma\delta}$ exhiben una respuesta proliferativa y lítica frente a células infectadas por el VIH y pueden suprimir la replicación viral mediante la liberación de citoquinas como IFN γ , TNF α y β -quimiocinas (Gougeon *et al.*, 2000; Poccia *et al.*, 1999).

A nivel intracelular, se han encontrado recientemente factores con actividad anti-VIH como APOBEC3G (del inglés, *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*), una proteína con una potente capacidad inhibitoria de la replicación viral, mediada por su capacidad citidina deaminasa que induce una hipermutación del genoma del VIH (Chiu y Greene, 2006). La proteína TRIM-5 α (del inglés, *Tripartite interaction motif 5 α*), también es un factor intracelular con poder restrictivo de la replicación del VIH (Strebel *et al.*, 2009).

2.2.2. Respuesta Inmunológica Adaptativa

2.2.2.1. Respuesta Inmunológica Humoral

La protección frente al VIH mediada por la respuesta humoral está representada principalmente por anticuerpos neutralizantes. Estos anticuerpos son predominantemente efectivos contra partículas virales libres, mientras que tienen un efecto limitado contra las células infectadas con el virus (Zinkernagel *et al.*, 2001). La mayoría de pacientes infectados por el VIH-1 presentan anticuerpos dirigidos frente a diferentes epítomos de las proteínas virales. Los anticuerpos dirigidos frente al bucle

V3 de la proteína gp120 viral, son los primeros en aparecer ([Javaherian et al., 1989](#)). También se ha descrito la presencia de anticuerpos frente a los dominios de unión al receptor CD4 y frente a la proteína gp41 ([Trkola et al., 1995](#)). Aunque varios trabajos han mostrado la acción neutralizante de estos anticuerpos, su aparición coincide con la emergencia de nuevas variantes virales que son resistentes a la neutralización, reflejando que los virus escapan fácilmente a este tipo de respuesta inmunológica ([Parren et al., 1999](#)), lo que sugiere un papel limitado para esta respuesta en el control de la infección.

2.2.2.2. Respuesta Inmunológica Celular

Un gran número de estudios sugieren un papel protector para la respuesta celular específica frente al VIH, mediada por las células T ([Migueles y Connors, 2002](#); [Pantaleo y Koup, 2004](#)). Las células T CD4⁺ y CD8⁺ ejercen su actividad mediante la secreción de citoquinas con efecto antiviral y moléculas que inducen citólisis de la célula infectada.

La respuesta mediada por las células T CD4⁺ se ha relacionado con un control más efectivo de la replicación viral tras la infección primaria ([Harari y Pantaleo, 2008](#)). Con respecto a las células T CD8⁺, existe evidencia tanto en modelos animales como en humanos de su importancia en el control de la replicación viral. Se ha descrito una clara asociación temporal entre estas células y la disminución de la viremia en la infección aguda ([Koup et al., 1994](#)). Uno de los estudios más importantes que apoya el papel de estas células en el control de la viremia, fue el llevado a cabo en Macacos Rhesus (*Maccaca mulatta*) a los que se eliminaron las células T CD8⁺ antes de ser infectados, observándose en ellos niveles mucho más

elevados de viremia y rápida progresión a SIDA ([Schmitz et al., 1999](#)). Otros estudios han analizado la existencia de una presión de selección inmunológica ejercida por este tipo de respuesta, tanto en modelos animales como en humanos. Estos estudios sugieren que las células T CD8+ VIH-específicas pueden modular la historia natural de la infección y que el virus puede rápidamente mutar para escapar del reconocimiento y control por estas células ([Borrow et al., 1997](#); [Goulder y Watkins, 2004](#)).

Diversos estudios llevados a cabo en los últimos años ponen de manifiesto la existencia de diversas alteraciones funcionales de los linfocitos T CD8+ específicos de VIH que podrían estar relacionadas con su incapacidad para controlar satisfactoriamente la replicación del virus ([Benito et al., 2004](#)). Un estudio reciente, sugiere que un mayor nivel de funcionalidad de las células T CD8+ de pacientes LTNP (del inglés, *long-term non-progressors*) podría estar relacionado con un mejor control de la replicación viral en dichos pacientes ([Betts et al., 2006](#)).

En la **Figura 5** se hace un resumen de la respuesta inmunológica frente al VIH.

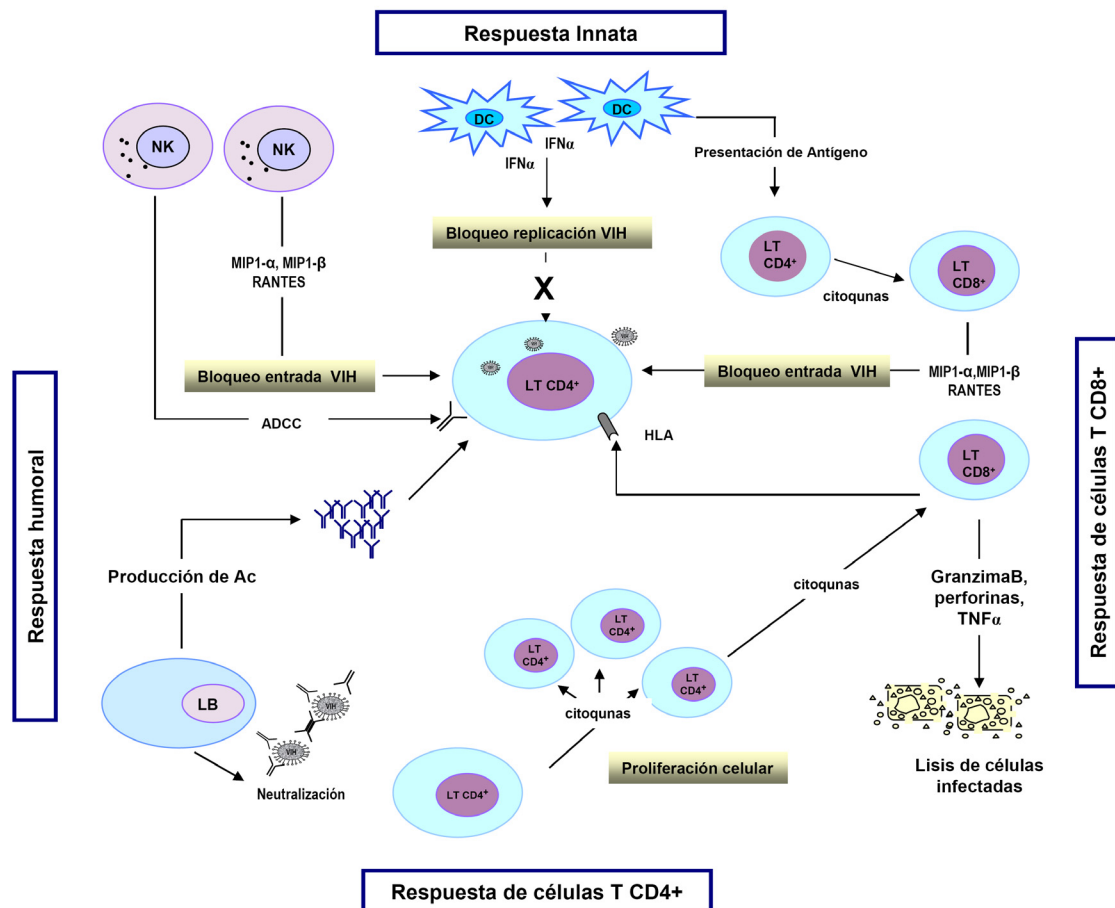


Figura 5. Respuesta inmunológica frente al VIH. **LT:** Linfocito T; **DC** (*Dendritic Cells*): Células dendríticas; **LB:** Linfocito B

2.3. Sujetos expuestos al VIH que permanecen seronegativos (HESN)

El curso de la infección con el VIH muestra una amplia variabilidad interindividual. La mayoría de individuos infectados progresan a SIDA en ausencia de TARGA en un periodo de 8-10 años (progresores típicos). Sin embargo, existen dos grupos extremos en cuanto a la velocidad de la progresión: algunos sujetos progresan a SIDA rápidamente (1-3 años) tras la infección primaria y son conocidos como progresores rápidos, mientras que otros individuos tienen una progresión lenta de la enfermedad, llamados LTNP. Los controladores de élite, son otro grupo interesante

de individuos los cuales mantienen niveles indetectables de replicación viral en ausencia de TARGA ([Deeks y Walker, 2007](#); [Pantaleo et al., 1995](#)). Por otra parte, existe otro grupo de individuos que permanecen seronegativos a pesar de estar expuestos en repetidas ocasiones al VIH y son denominados expuestos seronegativos (HESN, del inglés *HIV-exposed but seronegative*) ([Young et al., 2011](#)), los cuales no muestran evidencia clínica ni serológica de infección por VIH.

Dentro del grupo de individuos HESN, se han incluido recién nacidos de madres VIH+ ([Hygino et al., 2008](#)), trabajadoras sexuales ([Alimonti et al., 2006](#)), hemofílicos que han recibido hemoderivados infectados con el virus, usuarios de drogas intravenosas (UDI) que emplean jeringuillas contaminadas con el virus ([Makedonas et al., 2002](#)), trabajadores sanitarios que han tenido exposición percutánea a sangre contaminada ([Clerici et al., 1994](#)) y parejas homosexuales ([Erickson et al., 2008](#)) o heterosexuales ([Suy et al., 2007](#)) serodiscordantes, en la que uno de los miembros es VIH+.

No existe una explicación clara sobre los mecanismos que confieren la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en los HESN. Varios factores genéticos podrían modular la resistencia a la infección por el VIH y el mejor definido hasta el momento es la mutación delta-32 en el gen que codifica para el co-receptor CCR5, que aunque está claramente asociado con resistencia, está presente únicamente en un 1% de la población caucásica y es raro en otras razas ([Liu et al., 1996](#)). Por otra parte, se han sugerido diversos factores inmunológicos en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en HESN, entre los cuales se encuentra la repuesta de células T CD8+ ([Alimonti et al., 2006](#); [Erickson et al., 2008](#); [Furci et al., 2002](#)), los anticuerpos frente al co-receptor CCR5 del VIH ([Lopalco et al., 2000a](#)), los anticuerpos

específicos del VIH en mucosas y a nivel sistémico (Lo Caputo *et al.*, 2003), la producción incrementada de quimiocinas (Suresh *et al.*, 2007), defensinas (Trabattoni *et al.*, 2004) y la producción de citoquinas como IFN γ o IL2 (Kebba *et al.*, 2004; Pallikkuth *et al.*, 2007).

2.4. Factores del huésped involucrados en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en los individuos HESN

2.4.1. Factores Genéticos

2.4.1.1. HLA y KIR

Los genes que codifican para proteínas que conforman el antígeno leucocitario humano HLA son altamente polimórficos y codifican para moléculas que se expresan en la superficie celular. Se conocen principalmente dos clases de moléculas HLA: HLA clase I dentro de la cual se encuentran las moléculas A, B, C y clase II que comprende las moléculas DP, DR y DQ, que presentan estructura y funciones diferentes.

Durante la infección viral, las moléculas de HLA clase I presentan antígenos a los linfocitos T CD8+, los cuales posteriormente eliminan las células infectadas por lisis directa o mediante la producción de citoquinas. Diversos estudios han mostrado que ciertos alelos HLA clase I están correlacionados con el control de la infección por el VIH observado en sujetos LTNP y controladores de élite. La unión de los péptidos virales a estas moléculas desencadena la activación de la respuesta inmunológica celular dirigida hacia epítomos específicos, ejerciendo una presión inmunológica

sobre el VIH, lo cual resulta en mutaciones virales que incrementan la habilidad del virus para escapar de esta respuesta ([Goulder y Watkins, 2008](#)). En este contexto, un determinado alelo HLA clase I puede ser deletéreo o beneficioso para la infección por el VIH dependiendo de la habilidad del virus para escapar a la respuesta dirigida contra epítomos presentados por dicho alelo.

El papel de los alelos HLA en el desarrollo de resistencia a la infección ha sido descrito en recién nacidos sanos de madres infectadas y en HESN expuestos sexualmente ([MacDonald *et al.*, 1998](#); [Mackelprang *et al.*, 2008](#)). Se ha observado que en caso de concordancia HLA entre los recién nacidos y sus madres VIH+, las mismas mutaciones que permiten al virus escapar de la respuesta inmunológica de la madre, le llevarán a evadir también la respuesta en el recién nacido y si éstos están infectados con el VIH, también tienen un mayor riesgo de presentar una progresión rápida de la enfermedad. La discordancia del HLA entre la madre y el hijo podría ser protectora contra la transmisión viral, al permitir al hijo generar una respuesta contra los aloantígenos presentados por el HLA de las células de la madre infectada. Se ha observado que cuando hay concordancia de alelos HLA clase I entre la madre y el hijo, el riesgo de transmisión vertical está incrementado ([MacDonald *et al.*, 1998](#)). En algunas mujeres, el hecho de presentar homocigosis para moléculas HLA clase I, incrementa el riesgo de transmisión del VIH a sus hijos a través de la leche materna ([Mackelprang *et al.*, 2008](#)).

De otro lado, en cuanto a los supertipos HLA clase I, los cuales son grupos de alelos con afinidad por péptidos similares, se ha descrito que el supertipo HLA A2/68:02 está asociado con un riesgo reducido de transmisión perinatal al igual que con un disminuido riesgo de seroconversión en trabajadoras sexuales ([MacDonald *et al.*,](#)

2000; MacDonald *et al.*, 2001). Otros autores han encontrado que en pacientes VIH+, la presencia de alelos HLA del grupo Bw4 está asociado con una disminución del riesgo de transmisión del VIH, sugiriendo que estos alelos confieren resistencia a la transmisión (Welzel *et al.*, 2007). En un análisis realizado en un grupo de 429 parejas serodiscordantes heterosexuales, se encontró que algunos alelos HLA clase I, presentes en sujetos VIH+, se asociaban con mayor incidencia de transmisión del virus; en particular encontraron que la presencia del haplotipo HLA A*30-Cw*18-B*57 favorecía la no transmisión del VIH a sus parejas (Tang *et al.*, 2008). Más recientemente, se ha reportado que la presencia de algunos alelos HLA involucrados en la progresión de la infección, pueden también estar implicados en la transmisibilidad del virus por parte de pacientes VIH+. Sin embargo, estos mismos alelos no están implicados en la protección frente a la infección por el VIH (Gao *et al.*, 2010).

Moléculas no clásicas del HLA clase I como el HLA-G y el HLA-E pueden actuar como potentes moduladores de la respuesta inmunológica innata a través de la interacción con las células NK. Un grupo de investigadores mostraron que ciertos polimorfismos en el HLA-E y el HLA-G pueden influir de manera independiente o conjunta en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en parejas heterosexuales serodiscordantes (Lajoie *et al.*, 2006).

En cuanto a las moléculas HLA clase II, las cuales tienen un papel clave en la presentación de antígenos a las células T CD4+, Hardie *et al.*, han reportado una variedad de genotipos del HLA-DP y HLA-DQ asociados con la susceptibilidad al VIH en un grupo de trabajadoras sexuales. Entre estos se encuentran el alelo DPA*01:03:01, el cual se encontró asociado con una baja tasa de seroconversión y

con resistencia al VIH ([Hardie et al., 2008a](#)). De igual forma, estos autores encontraron una asociación del alelo DQB1*06:03 y el haplotipo DQA1*01:02:01-DQB1*06:03 con resistencia a la infección por el VIH ([Hardie et al., 2008b](#)).

Con respecto a los receptores KIR, un estudio, en el cual analizaron la interacción KIR-HLA en un grupo de HESN, sugiere que la resistencia a la infección por VIH se asocia con la presencia del gen inhibidor KIR3DL1, en ausencia de su ligando HLA específico (HLA-Bw4) ([Jennes et al., 2006](#)). Otro estudio encontró que la presencia de ciertos genes KIR activadores o la ausencia de ciertos genes KIR inhibidores, podrían contribuir al incremento de la activación de las células NK en sujetos HESN, lo cual podría favorecer la baja susceptibilidad al VIH en estos sujetos ([Ravet et al., 2007](#)). También se ha observado que la homocigosis para el gen KIR3DS1 se asocia con una mayor actividad de las células NK en un grupo de sujetos HESN, lo que podría contribuir a su resistencia a la infección ([Boulet et al., 2008b](#)). Curiosamente, también se ha encontrado que la combinación de altos niveles de expresión del receptor inhibidor KIR3DL1 (KIR3DL1*h/y) junto con la expresión de moléculas HLA-B*57, además de contribuir a un reducido riesgo de progresión de la infección, puede contribuir a un bajo riesgo de infección en HESN ([Boulet et al., 2008a](#)) (**Tabla 2**).

2.4.1.2. Quimiocinas y sus ligandos

Las quimiocinas son citoquinas quimiotácticas producidas por diferentes tipos celulares como las células T, macrófagos, células NK, células B y mastocitos. Estas moléculas están involucradas en el tráfico celular y en la modulación de la inflamación y la respuesta inmunológica. En algunos casos los receptores de las

quimiocinas sirven de entrada de patógenos dentro de la célula blanco para establecer la infección.

La existencia de determinados polimorfismos en varios receptores de quimiocinas, se ha asociado tanto al fenómeno de resistencia como al de progresión de la infección, lo cual tiene sentido, teniendo en cuenta que algunos de estos receptores (CCR5 y CXCR4 fundamentalmente) actúan como co-receptores de la entrada del VIH a la célula. Se han descrito diversas variaciones estructurales en el gen que codifica para el co-receptor CCR5 cuya prevalencia parece ser diferente en diversos grupos étnicos. La delección delta-32 en el gen que codifica este co-receptor (CCR5 Δ 32), provoca un cambio estructural que da lugar a una isoforma truncada y no funcional de esta molécula. La susceptibilidad a la infección por el VIH disminuye en individuos que presentan homocigosis para CCR5 Δ 32 ([Liu et al., 1996](#)). Un estudio reciente ha mostrado que la combinación de heterocigosis para CCR5 Δ 32 y el polimorfismo -2459 A/G en el promotor del gen que codifica para el CCR5, favorece la resistencia a la transmisión sexual del VIH en sujetos HESN ([Hladik et al., 2005](#)). Otro co-receptor del VIH, aunque menos común, es el CCR2. Se ha encontrado que un polimorfismo en el gen que codifica este co-receptor (CCR2-V64I), principalmente cuando se encuentra en homocigosis, puede favorecer la resistencia natural a la infección por el VIH ([Louisirirotchanakul et al., 2002](#)).

Polimorfismos en los genes que codifican para las quimiocinas MIP1 α , MIP1 β , RANTES, MIP α P (CCL3L1) y SDF-1, las cuales son ligandos de los co-receptores CCR5 o CXCR4, también pueden afectar la susceptibilidad al VIH. Variaciones en el promotor del gen que codifica para RANTES (-403G/A) pueden estar asociadas a una menor susceptibilidad y menor progresión de la infección ([McDermott et al.,](#)

2000). De igual forma, en otro estudio encontraron una asociación directa entre los niveles secretados de CCL3L1 (un potente ligando del CCR5), con el número de copias de su gen y una asociación inversa con la expresión de CCR5 en células T CD4+ en una cohorte de individuos VIH+ y HESN de diferentes etnicidades, encontrando que un bajo número de copias de CCL3L1 está presente más frecuentemente en individuos VIH+ que en individuos no infectados (González *et al.*, 2005). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en mujeres embarazadas VIH+, en el cual encontraron que un número elevado de copias de CCL3L1 estaba asociado con una reducida transmisión vertical del virus (Kuhn *et al.*, 2007). En contraste, más recientemente otros autores no encontraron un efecto significativo del número de copias del gen CCL3L1 sobre la infección por el VIH y concluyen que la variación natural en el número de copias de este gen no muestra ningún efecto en el control de la infección (Urban *et al.*, 2009) (Tabla 2).

Tabla 2. Factores genéticos asociados a la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en individuos HESN

Variantes genéticas	Referencias
HLA y KIR	
Supertipo HLA A2/6802	MacDonald <i>et al.</i> , 2000, 2001
Discordancia HLA clase I	MacDonald <i>et al.</i> , 1998
HLA-E*01:03	Lajoie <i>et al.</i> , 2006
HLA-G*01:05N	Lajoie <i>et al.</i> , 2006
HLA-DPA1*01:03:01	Hardie <i>et al.</i> , 2008a
HLA-DQB1*30:01	Hardie <i>et al.</i> , 2008b
Haplotipo HLA-A*30-Cw*18-B*57	Tang <i>et al.</i> , 2008
Grupo HLA-Bw4	Wezlel <i>et al.</i> , 2007
Expresión de KIR3DL1 en ausencia de su ligando específico HLA-Bw4	Jennes <i>et al.</i> , 2006
Co-expresión de KIR3DL1*h y HLA-B*57	Boulet <i>et al.</i> , 2008
Homocigosis para KIR3DS1	Ravet <i>et al.</i> , 2007
Co-receptores de quimiocinas y sus ligandos	
CCR5 Δ 32	Liu <i>et al.</i> , 1996
Combinación del polimorfismo del promotor CCR5-2459 A/G y CCR5 Δ 32	Hladik <i>et al.</i> , 2005
Número elevado de copias del gen CCL3L1	González <i>et al.</i> , 2005
Polimorfismo CCR2 -V64I	Louisirirothanakul <i>et al.</i> , 2002

2.4.1.3. Otros factores genéticos

La interleuquina 28B (*IL28B*) o IFN- λ 3 hace parte de la familia de los IFN tipo III y comparte características con los IFN tipo I ([Kotenko et al., 2003](#)) e induce (*in vitro*) protección frente a la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) ([Marcello et al., 2006](#)). Varios estudios han demostrado el papel del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés, *single nucleotide polymorphisms*) rs12979860 en la región cercana al gen que codifica para la *IL28B*, en el aclaramiento espontáneo del VHC ([Rallón et al., 2010](#); [Thomas et al., 2009a](#)) así como en la eliminación del virus tras el tratamiento ([Ge et al., 2009b](#); [Rallón et al., 2010](#); [Rauch et al., 2010](#); [Tanaka et al., 2009](#)).

El papel protector de este polimorfismo en la adquisición de la infección por el VHC en individuos que se exponen a este virus pero no se infectan, ha sido evaluado recientemente y se ha encontrado que la presencia del genotipo protector (CC) del SNP rs12979860 no está asociada con la resistencia a la infección por el VHC ([Knapp et al., 2011](#)). Se desconoce si el polimorfismo rs12979860 podría influir en la protección frente a la infección por otros virus como el VIH.

2.4.2. Factores inmunológicos

2.4.2.1. Inmunidad Innata

Son pocos los estudios realizados con respecto al papel de la inmunidad innata en la baja susceptibilidad al VIH en individuos HESN. Se ha descrito que la presencia abundante de macrófagos, células dendríticas y NK en las mucosas, podría estar

involucrada en la protección frente a la infección por el VIH-1 ([Lehner et al., 2008](#)). También se ha demostrado una alta producción de IFN γ , TNF α , CCL3, CCL4 y CCL5 por parte de las células NK, tanto de forma espontánea como después de la activación *in vitro* en HESN usuarios de drogas intravenosas comparado con sujetos VIH+, lo cual sugiere que las células NK podrían estar ejerciendo un papel en la protección frente al VIH ([Scott-Algara et al., 2003](#)). En otro estudio realizado en sujetos HESN expuestos sexualmente al virus, observaron una alta expresión de IFN γ por las células NK de estos individuos comparado con sujetos sanos y sugieren que la producción de IFN γ por estas células puede estar jugando un papel importante en la resistencia natural al virus en los individuos HESN ([Montoya et al., 2006](#)). Este mismo papel protector de las células NK se ha sugerido en la prevención de la transmisión madre-hijo en un estudio en el cual observan que las madres y los bebés que presentan una respuesta frente a péptidos del VIH por parte de sus células NK son significativamente menos propensos a transmitir o a adquirir la infección, respectivamente ([Tiemessen et al., 2009](#)).

Las defensinas también parecen tener un papel en la baja susceptibilidad al VIH en HESN. Se ha observado que ciertas mujeres HESN presentan un incremento en el número de células T CD8+ productoras de α -defensinas tanto en sangre como en muestras cervicales comparadas con controles no expuestos ([Trabattoni et al., 2004](#)). Sin embargo, a pesar de la actividad antiviral de estas moléculas, otro estudio encontró que altos niveles de α -defensinas estaban asociados con un incremento de la adquisición del VIH y sugieren que probablemente esto es debido a que la existencia de infecciones bacterianas transmitidas sexualmente y que favorecen la transmisión sexual el VIH, también inducen la producción de defensinas ([Levinson et al., 2009](#)).

Con respecto a las β -defensinas, producidas principalmente por células epiteliales, se ha demostrado que en la mucosa vaginal de mujeres HESN hay mayores niveles de ARN mensajero de β -defensinas que en sujetos no expuestos ([Zapata et al., 2008](#)). Un estudio reciente, ha demostrado que la presencia de ciertas variantes genéticas en el gen de la β -defensina-1, puede tener un papel protector frente a la infección por el VIH en niños hijos de madres infectadas ([Ricci et al., 2009](#)).

Otras proteínas y quimiocinas con actividad antiviral también se han investigado en diferentes cohortes de HESN, encontrándose por ejemplo, altos niveles de SLPI (del inglés, *secretory leukocyte protease inhibitor*) en secreciones vaginales de madres embarazadas VIH+. Estos niveles incrementados se han asociado a una reducida transmisión del virus durante el parto y niveles altos de esta proteína en niños lactantes con una reducida adquisición de la infección a través de la leche materna ([Farquhar et al., 2002](#)). Sin embargo, estos resultados no han sido corroborados en otros estudios en cohortes de parejas homosexuales serodiscordantes, en las cuales no se encontró ninguna asociación entre la actividad neutralizante de la saliva frente al virus y niveles altos de SLPI en la saliva de los sujetos HESN ([Hasselrot et al., 2010](#)). De otro lado, en un estudio proteómico, en el cual caracterizaron proteínas de la mucosa cervicovaginal de mujeres HESN, se encontró que niveles elevados de elafin/trappin-2, una proteína recientemente descubierta que hace parte del sistema inmunológico innato, en secreciones cervicovaginales se asociaban con la protección frente a la infección por el VIH ([Iqbal et al., 2009](#)) (**Tabla 3**).

Por otra parte, recientemente han sido descritos varios factores celulares del huésped que pueden restringir la replicación del VIH y por lo tanto bloquear el establecimiento de la infección después de la entrada del virus en la célula huésped.

El descubrimiento de estas moléculas con actividad antiviral innata ha llevado a considerar la posibilidad de que dichas moléculas puedan estar involucradas en la protección contra la infección por el VIH en los individuos HESN ([Sáez-Cirión et al., 2006](#); [Truong et al., 2003](#)). Un estudio reciente ha demostrado que la exposición al VIH puede inducir la expresión de APOBEC3G en linfocitos de individuos no infectados, y que la disminución de la exposición viral en sujetos HESN está asociada con una disminución en la expresión de esta proteína ([Vázquez-Pérez et al., 2009](#)). Biasin et al., demostraron que la expresión de APOBEC3G está altamente incrementada en CMSP (células mononucleares de sangre periférica) y en muestras cervicales de HESN comparado con muestras de sujetos no expuestos y que este incremento en la expresión de esta proteína se correlacionó además con una reducida susceptibilidad *in vitro* de las CMSP a ser infectadas por el VIH ([Biasin et al., 2007](#)).

Otro factor antiviral intracelular es la proteína TRIM5 α (del inglés, *tripartite motif*), la cual restringe la replicación de algunos retrovirus impidiendo la desencapsidación del genoma viral ([Kaur y Mehra, 2009](#)). En un estudio reciente se ha observado la presencia de altos niveles de esta proteína con alta actividad anti-VIH en una cohorte de mujeres HESN ([Sewram et al., 2009](#)). Polimorfismos en el gen que codifica para TRIM5 α , podrían restringir o modular la infección por el VIH. El polimorfismo más estudiado, el R136Q, está asociado a una gran actividad anti-VIH y ha sido reportado como el más frecuentemente encontrado en sujetos HESN ([Kaur y Mehra, 2009](#)) (**Tabla 3**).

2.4.2.2. Inmunidad Adquirida

2.4.2.2.1. Respuesta Inmunológica Humoral

La respuesta humoral está mediada por la familia de inmunoglobulinas secretadas por las células B (IgA, IgE, IgG e IgM) con diferente localización y funciones ([Brandtzaeg, 2009](#)). Dentro de los diferentes tipos de inmunoglobulinas, las más relevantes en el contexto de la transmisión del VIH son la IgA e IgG. La IgA se encuentra principalmente en mucosas (tracto genital e intestinal) y en el calostro, los cuales son lugares de importancia en la transmisión del VIH. La IgG se encuentra principalmente en el suero y provee protección a nivel sistémico.

Varios estudios han evaluado el papel de la respuesta humoral en la protección frente a la infección por el VIH en individuos HESN. En este sentido, es de especial interés la presencia de anticuerpos frente al VIH a nivel de mucosas, dado que es aquí donde se produce el primer contacto del sistema inmunológico con el virus en la mayoría de las ocasiones. La presencia de IgA específica frente al VIH ha sido demostrada en secreciones cérvico vaginales ([Hirbod *et al.*, 2008](#)), uretrales ([Lo Caputo *et al.*, 2003](#)), en saliva ([Hasselrot *et al.*, 2009b](#)) y a nivel sistémico ([Devito *et al.*, 2000b](#); [Hasselrot *et al.*, 2009a](#)) en individuos HESN. Estos anticuerpos pueden inhibir la transcitosi de aislados primarios de VIH y se han encontrado asociados con una reducción en la tasa de seroconversión ([Devito *et al.*, 2000a](#)). En otro estudio, se observó que la IgA de algunos sujetos HESN tenía actividad neutralizante cruzada frente a aislados primarios de VIH de diferentes subtipos (A, B, C y D) ([Devito *et al.*, 2002](#)). En algunos individuos HESN, se han observado anticuerpos de tipo IgA e IgG contra epítomos del CCR5 que pueden provocar una disminución en la

expresión de esta proteína, y de esta forma proteger contra la entrada del virus a la célula diana (Lopalco *et al.*, 2000a).

En un grupo de hombres homosexuales HESN, expuestos al virus principalmente por vía oral, se observó que la presencia de IgA neutralizante en saliva y en plasma, estaba asociada con altas cargas virales en sus respectivas parejas seropositivas. Además se encontró que este tipo de anticuerpos con actividad neutralizante frente al VIH, podía persistir en el tiempo tras continuas exposiciones al virus e incluso cuando las cargas virales en sus parejas se habían reducido a niveles indetectables tras el inicio del tratamiento antirretroviral (Hasselrot *et al.*, 2009a; Hasselrot *et al.*, 2009b). En contraposición al papel protector de la IgA en mucosas, Horton *et al.*, sugieren que la presencia de este anticuerpo en la mucosa cervical de mujeres HESN puede ser simplemente la consecuencia de exposiciones repetidas al virus, sin que haya una relación directa entre su presencia y la resistencia a la infección (Horton *et al.*, 2009). Es importante anotar que la presencia de IgA en las mucosas de los sujetos HESN no siempre ha sido detectada (Dorrell *et al.*, 2000) y que su presencia puede depender de una frecuente exposición al virus (Mazzoli *et al.*, 1999) (Tabla 3).

2.4.2.2.2. Respuesta Inmunológica Celular

El papel de la respuesta inmunológica celular específica frente al VIH en la protección frente a esta infección, fue postulado hace ya varios años con base a los resultados de algunos estudios donde observaron la presencia de respuesta de células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH, en diferentes grupos de individuos HESN (Clerici *et al.*, 1994; Kaul *et al.*, 2000; Alimonti *et al.*, 2006).

La respuesta de células T CD8+ específica del VIH, ha sido detectada en diferentes cohortes de individuos HESN y muchos autores han sugerido que estas células tienen un papel fundamental en la baja susceptibilidad a la infección. En individuos HESN cuyas parejas sexuales son VIH+, se ha encontrado respuesta de células T CD8+ específicas del VIH ([Skurnick et al., 2002](#)). Resultados similares se han obtenido en un grupo de trabajadoras sexuales tanto a nivel sistémico como de mucosas ([Alimonti et al., 2006](#); [Fowke et al., 2000](#); [Kaul et al., 2000](#)) y en una cohorte de UDI ([Makedonas et al., 2002](#)). No obstante, existen discrepancias con respecto a la presencia de respuesta celular específica frente al VIH en individuos HESN y su posible papel en la resistencia a la infección. Un estudio sugiere que esta respuesta podría jugar un papel importante en la protección contra la infección en HESN ([Pallikkuth et al., 2007](#)). Sin embargo, no todos los estudios han detectado dicha respuesta en estos sujetos ([Hladik et al., 2003](#)).

En cuanto a la especificidad de la respuesta de células T CD8+ en sujetos HESN, algunos investigadores han encontrado que las células T CD8+ aisladas de estos individuos, reconocen epítomos diferentes a los reconocidos por las células T CD8+ de pacientes VIH+, y que estos epítomos están restringidos por alelos HLA clase I previamente asociados con resistencia a la infección ([Kaul et al., 2001a](#)). Por otra parte, en cuanto a las características de la respuesta de las células T CD8+, Erickson *et al.*, demostraron una respuesta polifuncional con capacidad de lisar células infectadas, en una cohorte de varones HESN homosexuales ([Erickson et al., 2008](#)). Estos resultados sugieren que la baja susceptibilidad a la infección por VIH en HESN puede ser debida a la calidad más que a la cantidad de la respuesta de las células T CD8+ específicas del VIH.

En cuando a la respuesta mediada por los linfocitos T CD4+, varios estudios han sugerido la importancia de estas células en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en individuos HESN. En dos estudios independientes, se detectó respuesta de células T CD4+ específica del VIH en individuos HESN y dicha respuesta estaba mediada por IL2 (Fowke *et al.*, 2000; Pallikkuth *et al.*, 2007). También se ha observado una mayor producción de IFN γ por parte de células T CD4+ específicas del VIH en diferentes cohortes de mujeres y hombres HESN expuestos sexualmente al virus, comparados con sus parejas VIH+ y con individuos no expuestos (Eyeson *et al.*, 2003; Lo Caputo *et al.*, 2003; Promadej *et al.*, 2003). Sin embargo, en otro estudio, se encontraron niveles disminuidos de IFN γ en individuos HESN comparado con pacientes VIH+ (Hladik *et al.*, 2003).

En un trabajo realizado en recién nacidos de madres VIH+, se observó que la respuesta celular específica del VIH puede estar enmascarada por un incremento de las células T reguladoras (T_{reg}), dado que al eliminar dichas células se observaron altos niveles de respuesta específica del VIH mediada por células T (Legrand *et al.*, 2006).

La presencia de respuesta celular en diversas cohortes de sujetos HESN podría ser interpretada como una consecuencia de la exposición al virus y no necesariamente como la causa de la resistencia a la infección en estos individuos. Algunos estudios sugieren que una repetida exposición al VIH es necesaria para mantener una respuesta inmunológica específica (Jennes *et al.*, 2004; Pallikkuth *et al.*, 2007). Sin embargo, sólo unos pocos trabajos han analizado de forma prospectiva, tras un período de seguimiento, la posible asociación entre la existencia de respuesta celular o humoral con la probabilidad de infectarse. Kaul *et al.*, encontraron que la

seroconversión en dos trabajadoras sexuales HESN con respuesta celular frente al VIH, ocurrió cuando ésta respuesta había disminuido tras un período en el que habían interrumpido su actividad ([Kaul et al., 2001b](#)). En otro estudio se observó una menor incidencia de infección por VIH en un grupo de trabajadoras sexuales HESN en las cuales se detectó la presencia de respuesta celular, al compararlas con trabajadoras sexuales HESN que no presentaban esta respuesta ([Hirbod et al., 2008](#)). De igual manera, un grupo de HESN/UDI con respuesta celular específica frente al VIH presentó una tasa de seroconversión disminuida al compararlos con otro grupo de HESN/UDI que no presentaban este tipo de respuesta ([Makedonas et al., 2002](#)). Estos resultados, apoyan la hipótesis de que la respuesta inmunológica celular podría tener un papel importante en la prevención de la infección por VIH. Sin embargo, en contraposición a lo observado en estos estudios, Kaul et al., evaluaron una cohorte de trabajadoras sexuales HESN durante un año y no observaron asociación entre la presencia de respuesta celular específica del VIH en estas mujeres y la tasa de seroconversión ([Kaul et al., 2004](#)) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Factores inmunológicos asociados a una baja susceptibilidad a la infección por el VIH en individuos HESN

Tipo de respuesta inmunológica	Referencias
Innata	
Producción incrementada de MIP1 α , MIP1 β , RANTES e IFN γ por las células NK	Scott-Algara <i>et al.</i> , 2003
Incremento en la actividad de células NK	Lehner <i>et al.</i> , 2008
Respuesta de células NK a péptidos del VIH	Tiemessen <i>et al.</i> , 2009
Producción incrementada de α -defensinas por las células T	Levinson <i>et al.</i> , 2009
Niveles incrementados de ARNm de β -defensinas	Zapata <i>et al.</i> , 2008
Niveles elevados de elafin/trappin-2	Iqbal <i>et al.</i> , 2009
Niveles elevados de SLPI en saliva	Hasselrot <i>et al.</i> , 2010
Niveles incrementados de APOBEC3G	Saez-Ciri3n <i>et al.</i> , 2006. Biasin <i>et al.</i> , 2007
Niveles elevados de TRIM5 α	Sewram <i>et al.</i> , 2009
Adaptativa	
IgA específica frente al VIH a nivel sistémico y de mucosas	Hirbod <i>et al.</i> , 2008; Lo Caputo <i>et al.</i> , 2003; Hasselrot <i>et al.</i> , 2009a y 2009b.
IgA con actividad neutralizante frente al VIH	Devito <i>et al.</i> , 2002
Anticuerpos anti- CCR5	Lopalco <i>et al.</i> , 2000a
Respuesta de células T CD8+ específicas frente al VIH	Skurnick <i>et al.</i> , 2002; Alimonti <i>et al.</i> , 2006; Fowke <i>et al.</i> , 2000; Kaul <i>et al.</i> , 2000
Actividad polifuncional de células T CD8+	Erickson <i>et al.</i> , 2008
Expresión incrementada de granzimas y perforinas	Pallikkuth <i>et al.</i> , 2007
Producción incrementada de IFN γ por células T CD4+	Eyeson <i>et al.</i> , 2003; Promadej <i>et al.</i> , 2003
Alto porcentaje de células T CD4+ productoras de IL2 e IFN γ	Pallikkuth <i>et al.</i> , 2007

2.4.2.3. Células T doble negativas

Las células T doble negativas (DN), son células T que no expresan moléculas CD4 ni CD8 (CD3⁺CD4⁻CD8⁻). Al igual que ocurre con las células T convencionales CD4⁺ o CD8⁺, estas células pueden expresar TCR (del inglés, *T cell receptor*) de cadenas $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$) o de cadenas $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$).

En la infección por el VIH, las células $T\gamma\delta$ pueden suprimir la replicación del virus mediante la producción de $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ y β -quimiocinas (Gougeon *et al.*, 2000). Además, se ha observado que estas células pueden estar involucradas en el control espontáneo de la infección por el VIH en controladores de élite (Li *et al.*, 2008; Riedel *et al.*, 2009).

Con respecto a las células T DN/ $\alpha\beta$ algunos autores han sugerido que podrían tener propiedades inflamatorias (Crispin y Tsokos, 2009) y desplegar tanto funciones reguladoras (Fischer *et al.*, 2005) como colaboradoras (Milush *et al.*, 2011). En humanos, estas células han mostrado estar involucradas en la protección contra la adquisición de infecciones virales (Thomson *et al.*, 2006) y en el modelo animal con el virus de la inmunodeficiencia en simios se ha sugerido que estas células pueden tener un papel protector de la progresión a SIDA (Milush *et al.*, 2011). Hasta la fecha, no existen estudios que hayan evaluado la contribución de las células T DN en la respuesta frente al VIH en individuos HESN.

2.4.2.4. Alteraciones en el estadio de maduración y activación de las células T

Varios trabajos en individuos HESN han analizado la presencia de diversas alteraciones en las células T, similares a las que se observan en pacientes VIH+, tales como alteraciones en los niveles de activación y en el estadio de maduración de las células T. En diferentes cohortes de individuos HESN se ha observado una reducción en la proporción de células T naïve y un incremento en las células T de memoria (Schenal *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2006). Este fenómeno fue explicado como el resultado de la exposición viral en los individuos HESN, considerando que dicha exposición es suficiente para modular el cociente de células T memoria/células T

naïve ([Schenal et al., 2005](#)). En otros estudios se ha encontrado que algunos individuos HESN tienen niveles incrementados de activación de las células T comparados con sujetos no expuestos, sugiriendo que la infección activa no es necesariamente requerida para inducir la activación de las células T ([Biasin et al., 2000](#); [Jennes et al., 2003](#)). [Suy et al.](#), encontraron que los cambios en las células T memoria y en células T activadas de sujetos HESN se correlacionaban directamente con los niveles de carga viral de sus parejas VIH+, mientras que los cambios en las poblaciones naïve no mostraron esta correlación ([Suy et al., 2007](#)).

Por el contrario, otros estudios han encontrado bajos niveles de activación en las células T CD4+ de individuos HESN, sugiriendo que este fenómeno puede contribuir a la protección frente a la infección por el VIH en estos individuos ([Begaud et al., 2006](#); [Koning et al., 2005](#)). El hallazgo de un bajo nivel de activación en las células T y elevados niveles de células T_{reg} en un grupo de mujeres HESN, comparándolas con sujetos no expuestos, llevó a la conclusión que las células T_{reg} pueden contribuir a la resistencia frente a la infección por el VIH al disminuir el nivel de activación de las células T y por lo tanto su susceptibilidad a la infección ([Card et al., 2009](#)).

Diferentes patrones de comportamiento sexual pueden ayudar a explicar la discrepancia observada en los trabajos mencionados anteriormente. Los autores que postulan esta teoría, encontraron bajos niveles de activación de células T CD4+ en individuos HESN comparados con sujetos no expuestos. Esto parece estar asociado con un alto grado de uso de preservativo entre los sujetos HESN comparado con los controles sanos, lo que supondría una menor exposición a cualquier tipo de patógeno y por tanto una menor estimulación del sistema inmunológico. También se observó un mayor nivel de activación de las células T en mujeres comparado con

hombres, independientemente del comportamiento sexual. Estos resultados cuestionan la relevancia de los bajos niveles de activación en la resistencia a la infección por el VIH y subrayan la necesidad de tener en cuenta las características del comportamiento sexual en sujetos HESN a la hora de interpretar los resultados (Camara *et al.*, 2010).

2.5. Justificación del estudio

Los individuos HESN representan un modelo interesante para el estudio de factores del huésped potencialmente asociados con la protección frente a la infección por el VIH. Esta información puede ser empleada para el diseño de agentes inmunoterapéuticos que permitan el control de la infección en sujetos infectados y para la prevención de la infección, mediante en el desarrollo de vacunas profilácticas.

Los estudios realizados hasta el momento apuntan a una diversidad de factores del huésped relacionados con la respuesta inmunológica. Algunos de estos factores han sido evaluados en diferentes cohortes de individuos HESN pero de manera aislada. Otros factores no han sido estudiados en este tipo de individuos, tales como la respuesta inmunológica mediada por células T doble negativas o el polimorfismo rs12979860 cercano al gen de la *IL28B*. Por todo ello, en esta tesis se evalúa de manera simultánea en una cohorte de individuos HESN expuestos sexualmente al virus, la presencia de factores inmunológicos y genéticos que puedan estar involucrados en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en estos individuos.

3. Objetivos

1. Caracterizar la respuesta inmunológica celular específica frente al VIH en individuos HESN

- 1.1. Examinar la prevalencia, intensidad, amplitud y el perfil funcional de la respuesta de las células T CD4⁺ y CD8⁺.
- 1.2. Analizar la prevalencia y el perfil funcional de la respuesta de las células T doble negativas (CD3⁺CD4⁻CD8⁻)

2. Evaluar el estado de maduración y los niveles de activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺ de individuos HESN

- 2.1. Examinar la distribución de las distintas subpoblaciones de células T y su nivel de activación.
- 2.2. Analizar la asociación entre los niveles de activación y la respuesta inmunológica celular específica frente al VIH.

3. Caracterizar la respuesta humoral específica frente al VIH en individuos HESN

- 3.1. Evaluar la presencia de anticuerpos con actividad neutralizante frente a distintos aislados de VIH en el plasma de individuos HESN.
- 3.2. Determinar la presencia de anticuerpos frente a la envuelta del VIH.

4. Evaluar factores genéticos potencialmente implicados en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en sujetos HESN

- 4.1. Analizar la distribución de los alelos HLA clase I, HLA clase II y de sus supertipos.
- 4.2. Analizar la frecuencia de los genes, haplotipos y genotipos KIR.
- 4.3. Analizar la distribución de las variantes del polimorfismo rs12979860 cercano al gen de la interleuquina 28B (*IL28B*).

4. Pacientes y métodos

4.1. Población de estudio

Los individuos incluidos en esta tesis, fueron seleccionados de forma prospectiva, procedentes del Centro Sanitario Sandoval de Madrid (centro especializado en enfermedades de transmisión sexual) con seguimiento clínico en este centro. La población de estudio consistió en individuos HESN que mantenían una relación estable con su pareja infectada con el VIH+, durante al menos 12 meses previos al momento de la inclusión en el estudio. El nivel de exposición de los individuos HESN fue evaluado regularmente en cada visita. Para esto, los participantes fueron examinados para determinar la presencia de alguna infección de transmisión sexual (ITS) y completaron un cuestionario que incluía la información sobre su comportamiento sexual, así como sus prácticas de riesgo, recopilando la información sobre el número de contactos sexuales con o sin preservativo. Con esta información y de acuerdo con la carga viral de sus parejas VIH+ los individuos HESN se clasificaron dentro de tres niveles de exposición:

- a. Nivel de Exposición Muy bajo o Nulo: Uso de preservativo durante todos los contactos sexuales con su pareja VIH+, independientemente del nivel de carga viral de su pareja.
- b. Nivel de Exposición Bajo: Contactos sexuales sin protección frecuentes con su pareja VIH+ la cual presentaba carga viral VIH inferior a 50 copias/mL (<50 cop/mL).
- c. Nivel de Exposición Moderado-Alto: Contactos sexuales sin protección frecuentes con su pareja VIH+ la cual presentaba carga viral VIH superior a 50 cop/mL.

Para el primer objetivo *“Caracterizar la respuesta inmunológica celular específica frente al VIH en individuos HESN”*, se incluyeron tres grupos de individuos:

- a. Individuos HESN: Se incluyeron 24 individuos.
- b. Individuos VIH+: Se incluyeron 24 individuos VIH+, parejas estables de los individuos HESN.
- c. Sujetos control: Se incluyeron 20 individuos, voluntarios sanos seronegativos para la infección por el VIH y que no presentaban riesgo de exposición al virus, para establecer el valor de corte de la respuesta positiva de las células T CD4+ y CD8+ específicas frente al VIH.

Para analizar la prevalencia y el perfil funcional de la respuesta de las células T doble negativas ($CD3^+CD4^-CD8^-$) frente al VIH, se seleccionó un subgrupo de individuos de los que se disponía de CMSP: 13 individuos HESN, 13 pacientes VIH+ parejas estables de los individuos HESN y se aumentó el número de sujetos control a 35 individuos.

Para el segundo objetivo: *“Evaluar el estado de maduración y los niveles de activación de las células T CD4+ y CD8+ de individuos HESN”*, se incluyeron 3 grupos de individuos:

- a. Individuos HESN: Se incluyeron 18 individuos del grupo de 24 individuos HESN del objetivo 1.
- b. Individuos VIH+: Se incluyeron los 18 individuos del grupo de 24 individuos VIH+ parejas estables de los individuos HESN del objetivo 1.

- c.** Sujetos control: Se incluyeron los 20 individuos, voluntarios sanos seronegativos para la infección por el VIH y que no presentaban riesgo de exposición al virus del objetivo 1, como controles de los distintos parámetros a evaluar.

Para el tercer objetivo: *“Caracterizar la respuesta humoral específica frente al VIH en individuos HESN”*, se incluyeron tres grupos de sujetos de los que se disponía de muestra de plasma:

- a.** Individuos HESN: Se incluyeron 27 individuos.
- b.** Pacientes VIH+: Se incluyeron 27 individuos VIH+, parejas estables de los individuos HESN.
- c.** Sujetos Control: Se incluyeron 11 individuos, voluntarios sanos seronegativos para la infección por el VIH y que no presentaban riesgo de exposición al virus, como controles de los distintos parámetros a evaluar.

Para el cuarto objetivo: *“Evaluar factores genéticos potencialmente implicados en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en sujetos HESN”*, se incluyeron 3 grupos de individuos:

- a.** Individuos HESN: Se incluyeron 29 individuos.
- b.** Individuos VIH+: Se incluyeron 61 individuos VIH+ de los cuales 29 eran las parejas estables de los individuos HESN.

- c. Sujetos control: Se incluyeron 62 individuos, voluntarios sanos seronegativos para la infección por el VIH y que no presentaban riesgo de exposición al virus.

Para analizar la distribución de las variantes del polimorfismo rs12979860 cercano al gen de la *IL28B*, se incluyeron los 29 individuos HESN y sus parejas y 30 sujetos control.

4.2. Determinación de parámetros de laboratorio

La carga viral del VIH se determinó cuantificando el ARN viral en plasma, utilizando una técnica comercial de bDNA (*branched DNA assay*; Versant HIV-1 RNA v3.0 Siemens, Barcelona, España) con un límite de detección de 50 copias de ARN-VIH/mL.

El nivel de células T CD4⁺ se evaluó por citometría de flujo. La sangre total fue tratada con el kit comercial IMMUNOPREP (Beckman-Coulter, Miami, FL) que rompe los glóbulos rojos, estabiliza los leucocitos y fija la membrana celular. A continuación la muestra se incubó con el anticuerpo monoclonal CD4-RD1-PE de tetraCHROME (SFC112T4D11; Beckman-Coulter, Miami, FL) y se analizó empleando un citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). El resultado se expresó en forma de cifra absoluta de células por microlitro (μ L) de sangre y como porcentaje respecto al total de linfocitos circulantes.

4.3. Obtención de plasma y células mononucleares de sangre periférica

A partir de las muestras de sangre de los pacientes recogidas con EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) como anticoagulante, se aislaron inmediatamente el plasma y las CMSP de cada sujeto mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, USA). La sangre total se centrifugó a 2.000 rpm durante 30 minutos. El plasma se recogió y se mantuvo a -20°C hasta su uso. La fracción que contiene las CMSP se recogió y se lavó con PBS (Tampón Fosfato Salino) y se procedió al conteo de CMSP para la separación en alícuotas conteniendo un rango de CMSP entre 5 y 10 millones por alícuota. Para su criopreservación, las CMSP se resuspendieron en 90% de SBF (Suero Bovino Fetal) y 10% de DMSO (Dimetil-Sulfóxido). Las muestras de CMSP de cada paciente se preservaron a viabilidad congelándolas a -80°C durante las primeras 24 horas y posteriormente se guardaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento en los diferentes ensayos propuestos. Todos los estudios se realizaron en CMSP criopreservadas. En el momento del análisis las CMSP se descongelaron en baño de agua a 37°C y se resuspendieron en medio de cultivo completo R10 (RPMI conteniendo 10% de SBF, 2% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 0.1% de gentamicina). La viabilidad de las células fue siempre superior al 85%.

4.4. Extracción de ácidos nucleicos

A partir de una alícuota de 1 millón de CMSP, se extrajo el ADN total usando el kit de extracción QIAamp DNA kit (Qiagen, Barcelona, España). El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

4.5. Péptidos solapantes del VIH

Para el ensayo de producción intracelular de las citoquinas IFN γ y MIP1 β por parte de las células T CD4+ y CD8+, se empleó un conjunto de 769 péptidos solapantes provenientes de la secuencia consenso VIH-1 subtipo B (NIH AIDS Research & Reagent Program, Germantown, MD, USA). Los péptidos procedían de las distintas proteínas del VIH (Gag, Env, Pol, Vif, Vpr, Vpu, Nef, Tat, Rev) que abarcan la secuencia poliprotéica del virus. Cada péptido tenía 15 aminoácidos de longitud, con solapamiento de 11 aminoácidos con los péptidos adyacentes. Cada péptido individual fue reconstituido en DMSO a una concentración de 10 mg/mL. Para los ensayos de estimulación, los péptidos se agruparon en 11 grupos de acuerdo a la proteína de origen: Gag1, Gag2, Pol1, Pol2, Pol3, Env1, Env2, Env3, Nef, proteínas reguladoras 1(Tat, Vpu, Rev) y proteínas reguladoras 2 (Vif, Vpr) (**Tabla 4**).

Cada uno de estos grupos de péptidos contenía entre 61 y 83 péptidos individuales dependiendo del total de péptidos que abarcara cada proteína. La concentración de cada uno de los péptidos en el respectivo grupo fue de 100 μ g/mL y su concentración final en los cultivos fue de 2 μ g/mL.

Para el ensayo de producción de IFN γ y MIP1 β por las células T doble negativas (DN), la estimulación se hizo con los grupos de péptidos solapantes que abarcaban la proteína Gag (grupo Gag1 y grupo Gag2).

Tabla 4. Grupos de péptidos solapantes del VIH

Proteína de origen	Grupo /número de péptidos
Gag	Gag 1 / 61 péptidos Gag2 / 62 péptidos
Pol	Pol 1 / 83 péptidos Pol 2 / 83 péptidos Pol 3 / 83 péptidos
Env	Env 1 / 70 péptidos Env 2 / 70 péptidos Env 3 / 71 péptidos
Nef	Nef / 49 péptidos
Tat, Vpu, Rev Vif, Vpr	Reguladoras 1 / 68 péptidos Reguladoras 2 / 69 péptidos

4.6. Ensayo de producción intracelular de citoquinas por las células T CD4+ y CD8+

Se midió simultáneamente la producción de IFN γ y MIP1 β por las células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH en respuesta a la estimulación con los grupos de péptidos solapantes del VIH, empleando citometría de flujo multiparamétrica (FC 500 Flow cytometry system; Beckman Coulter, Fullerton, CA) (**Figura 6**).

4.6.1. Cultivo *in vitro*. Estimulación de CMSP

Para la determinación simultánea de la producción de IFN γ y MIP1 β por células T CD4+ y CD8+, se estimularon CMSP con los 11 grupos de péptidos solapantes del VIH ya definidos en el apartado anterior. Para el ensayo de estimulación se empleó un millón de CMSP que fueron cultivadas en placas de 96 pocillos durante 6 horas a

37°C con 5% de CO₂ en 250 µL de medio completo R-10, con cada uno de los grupos de péptidos a una concentración final de 2µg/mL para cada péptido individual.

Tras la primera hora de incubación se añadió a todos los pocillos Brefeldina A (GolgiPlug, 1µl/mL BD Biosciences, San Diego, CA) para inhibir la liberación de proteínas al medio extracelular. Los controles del experimento incluyeron como control negativo CMSP sin ningún tipo de estímulo y como control positivo estimulación de CMSP con 50 ng/mL de PMA (Phorbol 12-Mystrate 13-Acetate: SIGMA, Missouri, USA) más Ionomicina (1µM) (SIGMA-ALDRICH, Madrid, España).

4.6.2. Tinción para citometría de flujo

Después de las 6 horas de incubación, las células fueron recogidas y lavadas con 2 mL de PBS. Posteriormente fueron teñidas para la detección de marcadores de superficie con los anticuerpos monoclonales anti-CD4-PECy5 (Cytognos, Salamanca, España), anti-CD8-PECy7 y anti-CD3-ECD (Beckman Coulter, Fullerton, CA) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con 2 mL de PBS y permeabilizadas con 250 µL de la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA) durante 20 minutos a 4°C. Las células permeabilizadas fueron lavadas con 2 mL de la solución tampón Perm/Wash (BD Biosciences, San Diego, CA) y teñidas para la detección de marcadores intracelulares incubando durante 30 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-IFN γ -PE (BD Biosciences) y anti-MIP1 β -FITC (R&D Systems, Mineapolis, MN).

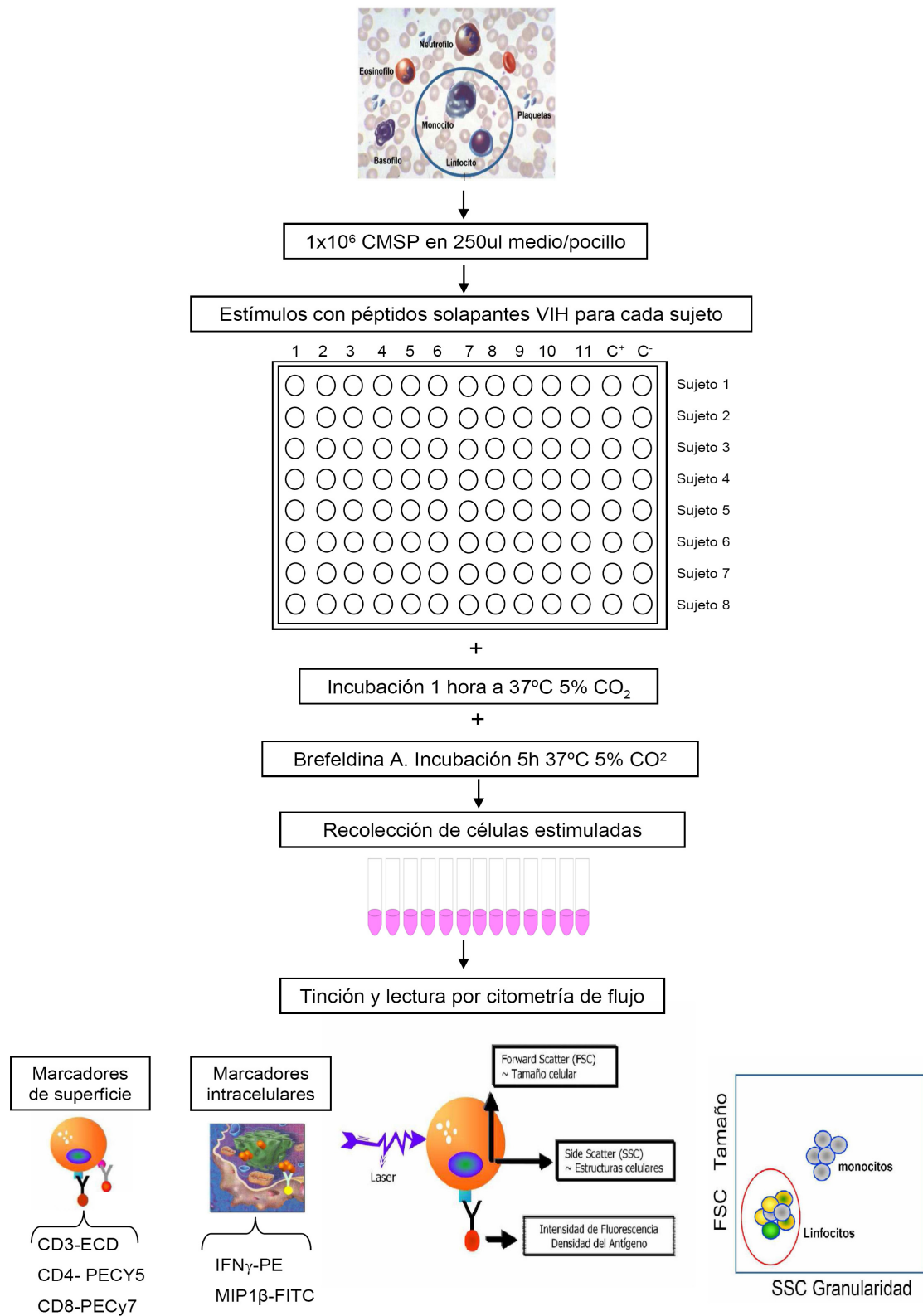


Figura 6. Procedimiento metodológico para evaluar la producción intracelular de citoquinas

Después de la tinción intracelular, las células se lavaron nuevamente con 2 mL de la solución tampón Perm/Wash y se resuspendieron en 250 µL de PBS para la posterior adquisición en el citómetro de flujo de 5 colores, Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

4.6.3. Análisis por citometría de flujo multiparamétrica

Para cada muestra se adquirieron un mínimo de 50.000 células T CD4+ y 50.000 células T CD8+. El análisis de los datos fue realizado usando el software CXP (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Las regiones de análisis fueron hechas sobre las células CD3+CD4+ y células CD3+CD8+. Un ejemplo representativo del análisis por citometría de flujo se muestra en la **Figura 7**.

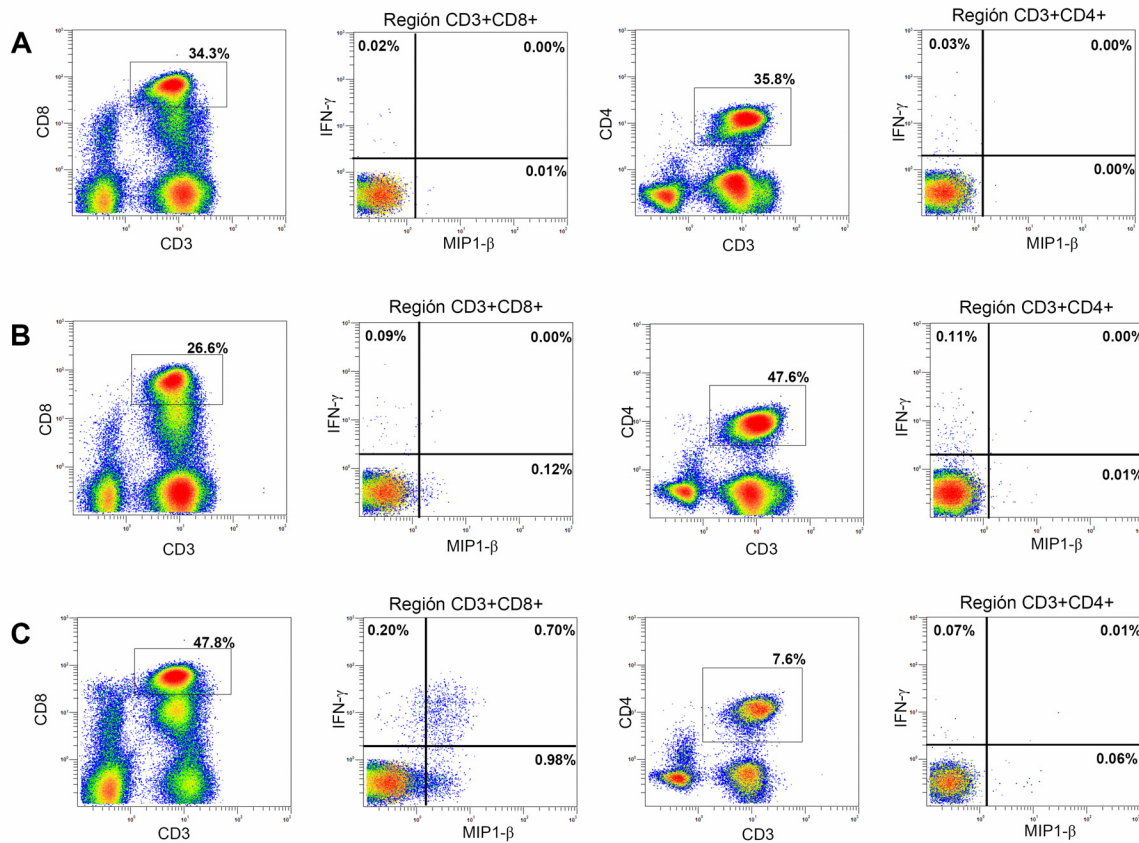


Figura 7. Ejemplo representativo del análisis por citometría de flujo de la respuesta de células T CD4+ y CD8+ frente a péptidos del VIH en controles sanos no expuestos (**A**), individuos HESN (**B**) y pacientes VIH+ (**C**)

De acuerdo a la expresión de IFN γ y/o MIP1 β se definieron tres subpoblaciones funcionales de células T CD4+ y tres de células T CD8+ (**Figura 8**).

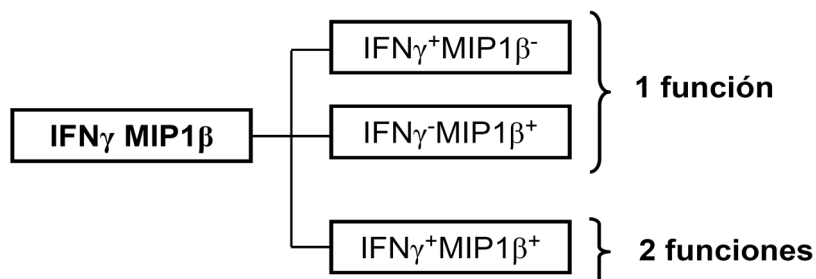


Figura 8. Esquema de subpoblaciones funcionales excluyentes, definidas de acuerdo a la expresión de IFN γ y/o MIP1 β , agrupadas por número de funciones

Para cada una de éstas subpoblaciones funcionales se definió un valor de corte por encima del cual se consideró la respuesta como positiva. Para esto, se agruparon todos los valores obtenidos tras la estimulación con los 11 grupos de péptidos en los 20 sujetos controles seronegativos no expuestos. Posteriormente, se escogió el percentil 99 de la distribución de los datos obtenidos en los 20 controles no expuestos para determinar el valor de corte para la respuesta positiva para cada una de las subpoblaciones funcionales T CD4+ y T CD8+ (**Tabla 5**). Una muestra se consideró positiva cuando superaba el valor umbral después de restar el valor obtenido en su control negativo (células sin estimular).

Tabla 5. Valores de corte para la respuesta positiva para cada una de las tres subpoblaciones excluyentes de células T CD4+ y células T CD8+

Subpoblación excluyente	Valor de corte (%)
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ MIP β ⁻	0.08
CD4 ⁺ IFN γ ⁺ MIP β ⁺	0.02
CD4 ⁺ IFN γ ⁻ MIP β ⁺	0.03
CD8 ⁺ IFN γ ⁺ MIP β ⁻	0.14
CD8 ⁺ IFN γ ⁺ MIP β ⁺	0.03
CD8 ⁺ IFN γ ⁻ MIP β ⁺	0.04

4.7. Parámetros de respuesta inmunológica de las células T CD4+ y CD8+

Para caracterizar los aspectos cuantitativos y cualitativos de la respuesta inmunológica celular específica de las células T CD4+ y CD8+ frente al VIH, se examinaron los siguientes parámetros:

- La **prevalencia** de la respuesta, se definió como el porcentaje de individuos con respuesta positiva de células T CD4+ y/o CD8+ frente a al menos uno de los grupos de péptidos VIH y mediada por al menos una de las tres subpoblaciones funcionales.
- La **intensidad** de la respuesta, se definió como el porcentaje de células T CD4+ y/o CD8+ que respondieron frente al estímulo con los diferentes grupos de péptidos del VIH.
- La **amplitud** de la respuesta, se definió como el número de proteínas virales distintas frente a las cuales hubo respuesta positiva de las células T CD4+ y/o CD8+.
- El **perfil funcional** de las células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH, se evaluó como el porcentaje de contribución de cada una de las tres subpoblaciones funcionales excluyentes a la respuesta total CD4+ o CD8+. Además se evaluó la contribución de todas las células T CD4+ o CD8+ que producían una sola citoquina (una función: $\text{IFN}\gamma^+\text{MIP1}\beta^-$, $\text{IFN}\gamma^-\text{MIP1}\beta^+$), la contribución de las células que producían dos citoquinas (dos funciones: $\text{IFN}\gamma^+\text{MIP1}\beta^+$) así como las que producían una citoquina particular ($\text{IFN}\gamma^+$ ó $\text{MIP1}\beta^+$).

La respuesta total de las células T CD4+ o CD8+ específicas del VIH fue calculada como la suma de la respuesta frente a las diferentes proteínas del VIH por parte de cada una de las tres subpoblaciones funcionales excluyentes.

4.8. Análisis fenotípico de las células T doble negativas (DN) ($CD3^+CD4^-CD8^-$)

Se evaluaron los niveles de células T DN que expresan el TCR de cadenas $\gamma\delta$ ($DN/\gamma\delta^+$) y las que expresan el TCR de cadenas $\alpha\beta$ ($DN/\alpha\beta^+$) empleando citometría de flujo multiparamétrica a partir de CMSP criopreservadas. Un millón de CMSP se incubaron durante 30 minutos a 4°C con los anticuerpos monoclonales anti-CD3-ECD (Beckman-Coulter, Miami, FL, USA), anti-CD4-PE/CY647, anti-CD8-PE/CY647 (Immunotools, Friesoythe, Germany), anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) y anti-TCR $\gamma\delta$ -PE (eBioscience, San Diego, CA, USA). Tras la incubación, las células fueron lavadas con 2 mL de PBS y posteriormente resuspendidas en 250 μ L de PBS para la adquisición en el citómetro de flujo.

Para cada muestra, se adquirieron un mínimo de 50.000 células $CD3^+$ y el análisis de los datos fue realizado usando el software CXP. En la región de los linfocitos, las células $DN/\gamma\delta^+$ fueron definidas como $CD3^+CD4^-CD8^-TCR\gamma\delta^+$ y las $DN/\alpha\beta^+$ como $CD3^+CD4^-CD8^-TCR\alpha\beta^+$.

4.9. Ensayo de producción intracelular de citoquinas por las células T DN

Se midió simultáneamente la producción de $IFN\gamma$ y $MIP1\beta$ por las células T $DN/\gamma\delta^+$ y $T DN/\alpha\beta^+$ en respuesta a la estimulación con péptidos de la proteína Gag del VIH, empleando citometría de flujo multiparamétrica. Tres millones de CMSP fueron estimuladas con dos grupos péptidos solapantes (Gag1 y Gag2) que abarcaban la proteína Gag (123 péptidos). Se incubaron por 6 horas a 37°C y 5% de CO_2 en

placas de 96 pocillos con 250 μ L de medio completo R-10. La concentración final de cada péptido en el cultivo fue de 2 μ g/mL.

Los controles del experimento incluyeron como control negativo, CMSP sin estimular y como control positivo se realizó estimulación con PMA (50 ng/mL) (SIGMA, Missouri, USA) más Ionomicina (1 μ M) (SIGMA-ALDRICH, Madrid, España). Durante la primera hora de incubación se añadió a todos los pocillos Brefeldina A (1 μ L/mL) (Biosciences, San Diego, CA) para inhibir la liberación de proteínas al medio extracelular.

Después de las 6 horas de incubación, las células fueron recogidas y lavadas con 2 mL de PBS. Posteriormente fueron teñidas para la detección de marcadores de superficie incubando con los anticuerpos monoclonales: anti-CD3-ECD, anti-CD4-PE/CY647, anti-CD8-PE/CY647 y anti-TCR $\gamma\delta$ -PE durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas con 2 mL de PBS y permeabilizadas con 750 μ L de la solución Cytofix/Cytoperm durante 20 minutos a 4°C. Las células permeabilizadas fueron lavadas con 2 mL de la solución tampón Perm/Wash y teñidas para la detección de marcadores intracelulares incubando durante 30 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti IFN γ -PECy7 (BD Biosciences) y anti-MIP1 β -FITC (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Después de la tinción intracelular, las células fueron nuevamente lavadas con 2 mL de la solución tampón Perm/Wash y se resuspendieron en 250 μ L de PBS para la posterior adquisición en el citómetro de flujo.

Para cada muestra se adquirieron un mínimo de 50.000 células T DN y el análisis de los datos fue realizado usando el software CXP. Las regiones de análisis fueron hechas sobre las células $CD3^+CD4^-CD8^-TCR\gamma\delta^+$ y $CD3^+CD4^-CD8^-TCR\gamma\delta^-$. Dado que en el análisis fenotípico todas las células $CD3^+CD4^-CD8^-TCR\gamma\delta^-$ expresaron el marcador $TCR\alpha\beta$, consideramos las células $CD3^+CD4^-CD8^-TCR\gamma\delta^-$ como células DN/ $\alpha\beta^+$. En la **Figura 9**, se muestra un ejemplo representativo del análisis por citometría de flujo de la producción de $MIP1\beta$ y/o $IFN\gamma$ por las células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$ tras la estimulación con PMA/Ionomicina y péptidos de Gag.

De acuerdo a la expresión de $IFN\gamma$ y/o $MIP1\beta$ se definieron las siguientes subpoblaciones funcionales excluyentes para las células DN/ $\gamma\delta^+$ y para las células DN/ $\alpha\beta^+$: $IFN\gamma^+MIP1\beta^-$, $IFN\gamma^+MIP1\beta^+$ y $IFN\gamma^-MIP1\beta^+$ (ver **Figura 8**).

Para cada una de éstas subpoblaciones funcionales se definió un valor de corte a partir del cual se consideró la respuesta positiva, para lo cual se analizaron CMSP de 35 controles no expuestos. Debido al alto fondo de respuesta observado en las células no estimuladas y para ser más estrictos e incrementar la especificidad de los ensayos, se empleó el cociente entre el nivel de respuesta para cada subpoblación funcional en presencia y en ausencia del estímulo con péptidos. Posteriormente, se eligió el percentil 99 de la distribución de los datos obtenidos en los 35 controles no expuestos, como valor umbral para la respuesta positiva para cada subpoblación funcional.

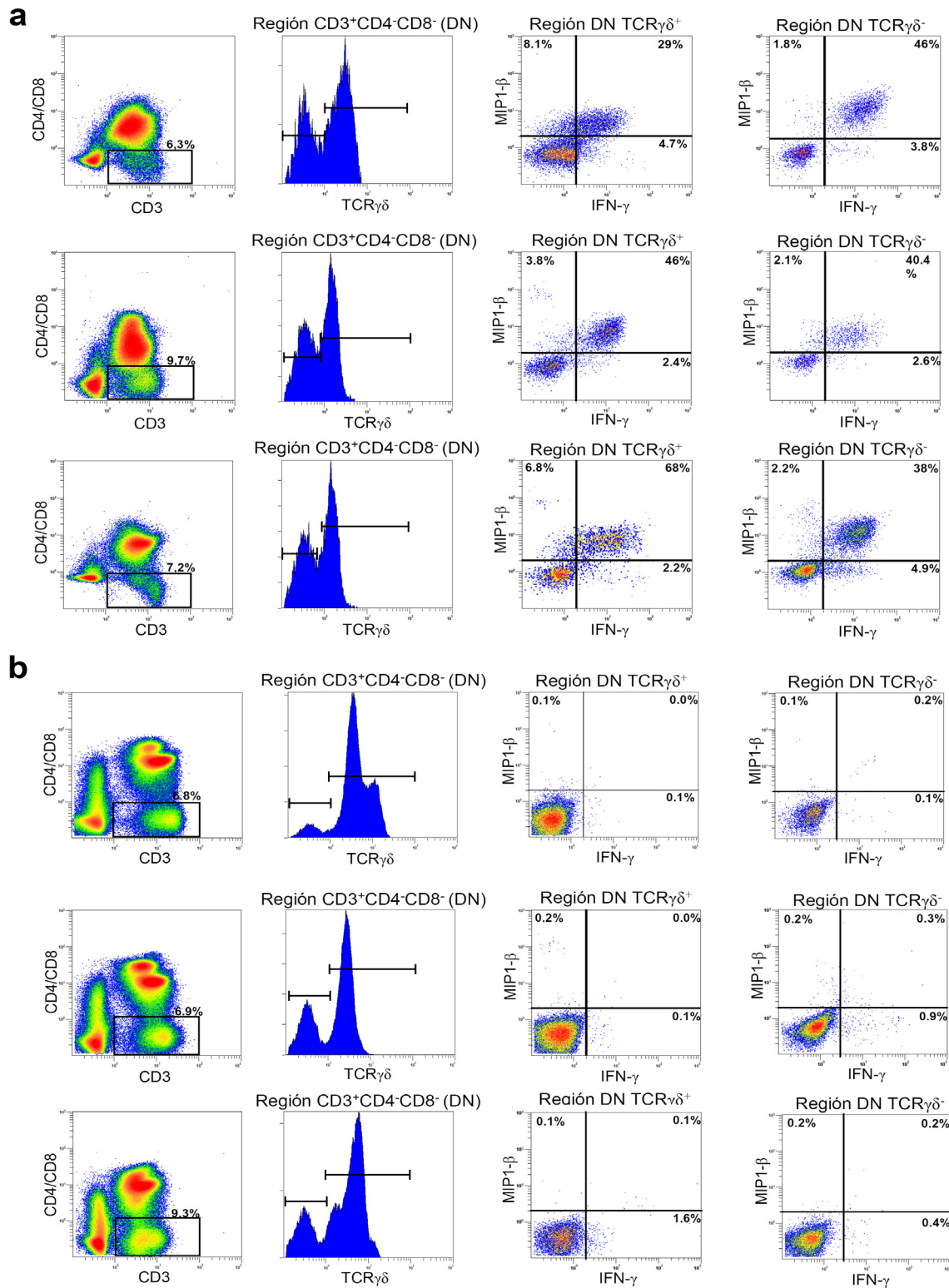


Figura 9. Ejemplo representativo del análisis por citometría de flujo de la respuesta de las células T DN/ $\gamma\delta$ ⁺ y DN/ $\alpha\beta$ ⁺ tras la estimulación con PMA/Ionomicina (**a**) y con péptidos de Gag (**b**) en controles no expuestos (fila superior), individuos HESN (fila central) e individuos VIH⁺ (fila inferior) para las figuras a y b.

Dado que se emplearon dos grupos de péptidos de Gag (Gag 1 y Gag2) para los ensayos, se obtuvieron diferentes valores de corte para cada subpoblación funcional y para cada grupo de péptidos para células T DN/ $\gamma\delta^+$ para las células T DN/ $\alpha\beta^+$ (**Tabla 6**).

Tabla 6. Valores de corte (expresados como cociente) para la respuesta positiva para cada una de las subpoblaciones excluyentes de células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$

Subpoblación Excluyente	Valor de corte (cociente)	
	Estímulo con grupo Gag1	Estímulo con grupo Gag2
DN/TCR $\delta\gamma^+$ IFN γ^+ MIP β^-	3.83	7.00
DN/TCR $\delta\gamma^+$ IFN γ^+ MIP β^+	4.00	3.00
DN/TCR $\delta\gamma^+$ IFN γ^- MIP β^+	2.00	2.57
DN/TCR $\alpha\beta^+$ IFN γ^+ MIP β^-	5.52	5.57
DN/TCR $\alpha\beta^+$ IFN γ^+ MIP β^+	10.45	11.00
DN/TCR $\alpha\beta^+$ IFN γ^- MIP β^+	3.30	10.65

La respuesta específica frente a Gag de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$ en los individuos HESN y los pacientes VIH+, se consideró positiva cuando se cumplían los siguientes criterios: 1) que la respuesta estuviera por encima del valor umbral establecido como cociente a partir de los datos obtenidos en el grupo de controles no expuestos (**Tabla 6**); 2) que el porcentaje de células positivas (productoras de alguna citoquina) fuera superior al 0.1% después de restar el valor obtenido en el control negativo del experimento.

4.10. Análisis del estado de maduración y activación de las células T CD4+ y CD8+

El estado de maduración de las células T CD4+ y CD8+ se determinó basado en la expresión combinada de los marcadores CD45RA y CD27, definiéndose cuatro subpoblaciones celulares: naïve (CD45RA+CD27+), memoria central (CD45RA-CD27+), memoria efectora (CD45RA-CD27-) y efectora, completamente diferenciada (CD45RA+CD27-). El estado de activación de las células T CD4+ y T CD8+ se analizó empleando la expresión de los marcadores de activación CD38 y HLA-DR. Todos estos parámetros se analizaron simultáneamente mediante citometría de flujo multiparamétrica.

Para este propósito se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD4-PECy7, anti-CD8-PECy7, anti-HLA-DR-PECy5, anti-CD38-FITC, anti-CD45RA-ECD (Beckman Coulter, Fullerton, CA) y anti-CD27-PE (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Un millón de CMSP se incubaron por 30 minutos a 4°C con dos combinaciones distintas de anticuerpos monoclonales: CD4/CD27/CD45RA/HLA-DR/CD38 y CD8/CD27/CD45RA/HLA-DR/CD38. Posteriormente las células fueron lavadas con 2 mL de PBS y resuspendidas en 250 µL de PBS para la posterior adquisición en el citómetro de flujo. Para cada muestra, se adquirieron un mínimo de 50.000 células T CD4+ o CD8+^{brillantes} (células con alta expresión del marcador CD8). El análisis de los datos fue realizado usando el software CXP (**Figura 10**).

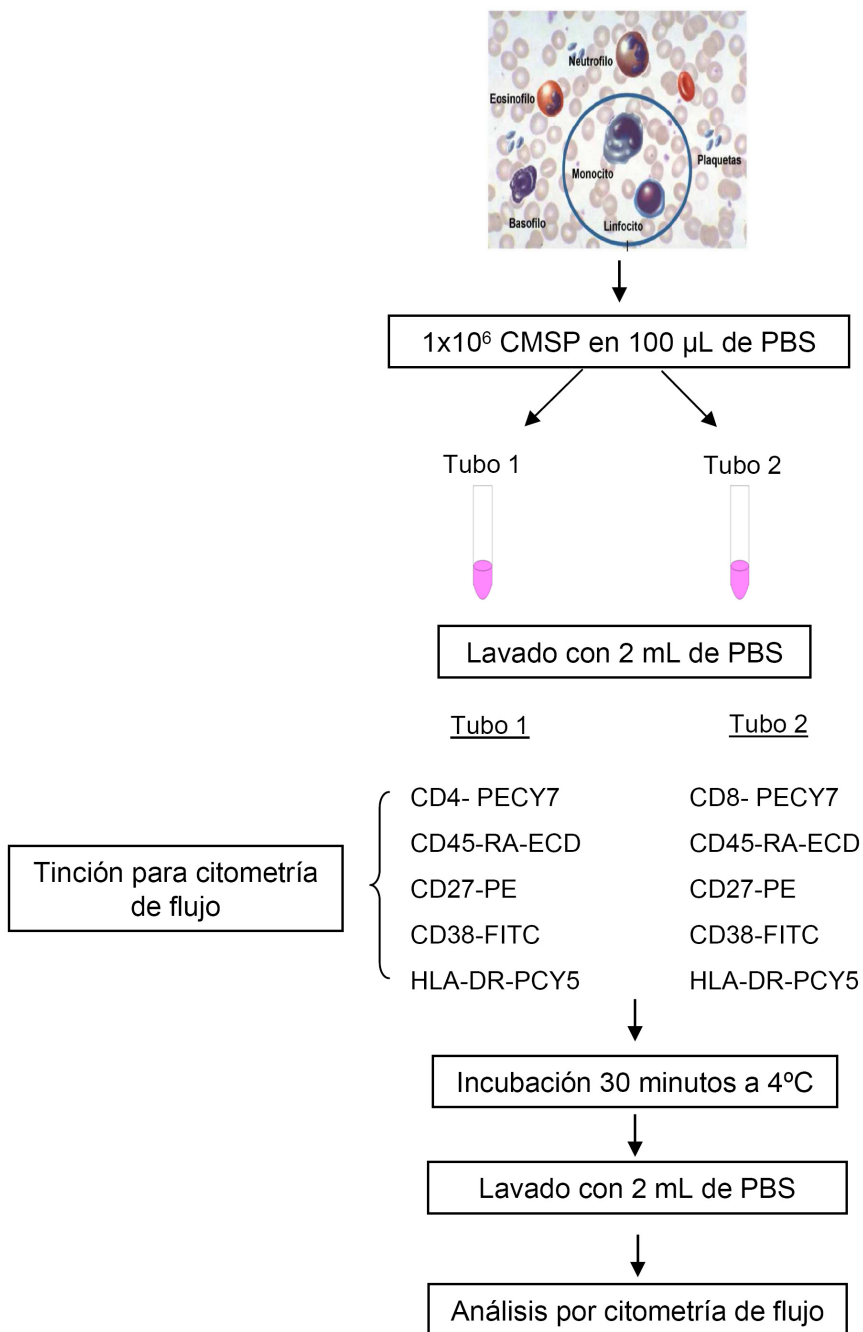


Figura 10. Procedimiento para determinar el estado de maduración y activación de las células T CD4+ y CD8+.

4.11. Caracterización de la respuesta humoral específica frente al VIH

4.11.1. Líneas celulares

Para este estudio se emplearon las siguientes líneas celulares: **a)** 293T (ATCC, *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) y TZM-bl (NIH AIDS Research Reagent program, Germantown, MD, USA), que son células de origen humano permisivas para la infección por el VIH y contienen un gen de luciferasa que sirve como indicador de replicación viral. Estas células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco modified Eagle medium*, Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de SBF y penicilina/estreptomicina.

b) MOLT-4/CCR5 (NIH AIDS Research Reagent program, Germantown, MD, USA). Éstas son células que expresan los receptores de membrana CD4 y CCR5 y se emplearon sin infectar o infectadas de manera crónica con los aislados del VIH NL4-3 y BaL, los cuales tienen tropismo X4 y R5 respectivamente. **c)** HUT (NIH AIDS Research Reagent program, Germantown, MD, USA), las cuales expresan en su membrana las moléculas CD4, CXCR4 y CCR5.

Tanto la línea celular MOLT-4/CCR5 como la HUT fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI-1640 (Invitrogen, Barcelona, España) suplementado con 10% de SBF.

4.11.2. Detección de anticuerpos neutralizantes

En primer lugar, las envueltas de los aislados del VIH, NL4-3, BaL y AC10 fueron clonadas en plásmidos de expresión de envuelta que se emplearon junto al plásmido desprovisto de envuelta (pSGΔEnv) para el proceso de cotransfección y generación

de pseudovirus (virus que solo expresan la envuelta viral del VIH). La co-transfección se realizó incubando los plásmidos con la línea celular 293T por 24 horas a 37°C. Posteriormente, los sobrenadantes de los cultivos fueron recogidos, filtrados, alícuotados y almacenados a -80°C para su posterior utilización en el ensayo de neutralización.

La cantidad de virus capaz de infectar el 50% de las células del cultivo (TCID₅₀, *Tissue culture infective dose 50*) para los diferentes pseudovirus fue determinada empleando las células TZM-bl. Diez mil de éstas células se infectaron con diluciones seriadas de los diferentes pseudovirus por cuadruplicado en placas de 96 pocillos y en presencia de 37,5 µg de DEAE-dextran/mL (Diethylaminoethyl-ether of dextran) durante 48 horas a 37°C, para incrementar la susceptibilidad de las células en cultivo a la infección. Los cultivos fueron analizados mediante un luminómetro (Labsystems, Waltham, MA, USA) empleando el reactivo Britelite (Britelite Luminescence Reporter Gene Assay System; Pekin Elmer Life Sciences, Madrid, España) para facilitar la lisis celular y la reacción enzimática de la luciferasa, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

La presencia de anticuerpos neutralizantes contra el VIH fue evaluada en un ensayo similar, con el gen reportero de la luciferasa. Una cantidad de pseudovirus equivalente a 200 TCID₅₀ fue preincubada por 1 hora a 37°C 5% CO₂ en placas de 96 pocillos con distintas diluciones de plasma (por duplicado) de los individuos a estudiar (previamente inactivado a 56°C por 30 minutos). Posteriormente, ésta mezcla fue usada para infectar las células TZM-bl de la misma forma que se describe en el apartado anterior. La actividad neutralizante se calculó como el

porcentaje de inhibición alcanzado, comparando con la actividad luciferasa observada en un control positivo de la infección (células TZM-bl infectadas con pseudovirus sin preincubación con el plasma).

4.11.3. Detección de anticuerpos frente la envuelta viral

Se determinó la presencia de anticuerpos tipo IgG o IgA frente a las glicoproteínas de la envuelta viral, empleando citometría de flujo. Para ello las células MOLT-4/CCR5, tanto no infectadas como infectadas con los aislados del VIH NL4-3 o BaL, fueron incubadas con una dilución 1/10 del plasma de cada uno de los sujetos del estudio durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con anti-IgG-PE y anti-IgA-Dylight649 (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) como anticuerpos secundarios para revelar los anticuerpos del plasma que se hubieran unido a la envuelta viral. Los controles negativos consistieron en una tinción solo con el anticuerpo secundario. Se determinó para cada condición experimental el porcentaje de eventos positivos. El reconocimiento específico de la envuelta fue calculado restando al porcentaje de eventos positivos en las células infectadas el porcentaje de eventos positivos en las células no infectadas. La reactividad del plasma frente a otras proteínas virales distintas de la envuelta se controló determinando la ausencia de proteína viral Gag p24 en la superficie de las células MOLT infectadas, mediante tinción con el anticuerpo anti-p24 KC57-RD1 (Beckman Colulter, Fullerton, CA, USA). Como control positivo se empleó el anticuerpo monoclonal b12 (4 µg/mL, Polymun, Viena, Austria) dirigido frente a la gp120.

En paralelo, se determinó la presencia de anticuerpos dirigidos contra epítomos crípticos de la envuelta viral, es decir, aquellos epítomos que quedan expuestos solamente tras la unión de la envuelta con la molécula CD4 (LaCasse *et al.*, 1999). Para esto, se adicionó CD4 soluble (CD4s) (2 µg/mL, AIDS Reagent and Reference Program, Germantown, MD, USA) a las células MOLT-4/CCR5 antes de la incubación con el plasma de los sujetos HESN como se describe en el apartado anterior. En este ensayo, se empleó el anticuerpo monoclonal b12 (4 µg/mL, Polymun, Viena, Austria) como control para comprobar el bloqueo del sitio unión de la proteína de la envuelta viral gp120 con la molécula CD4s, mientras que el anticuerpo monoclonal 17b (AIDS Reagent and Reference Program, Germantown, MD, USA) se empleó para confirmar la exposición de epítomos en la proteína gp120 inducidos tras la unión con la molécula CD4s.

4.11.4. Reactividad frente a moléculas de la membrana celular (CD4+, CCR5 y CXCR4) involucradas en la entrada del VIH

Para excluir la posibilidad de que la reactividad en el ensayo de reconocimiento de envuelta fuera debida a reconocimiento de moléculas de la célula huésped, claves para la entrada viral (CD4, CXCR4 o CCR5), se empleó la línea celular HUT que expresa éstas moléculas y se incubó con diferentes diluciones de plasma por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas y la unión de anticuerpos presentes en el plasma, se detectó mediante el marcaje con los anticuerpos secundarios anti-IgG-PE y anti- IgA-Dylight649 (Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA, USA). Los controles negativos se hicieron empleando solo anticuerpos secundarios. La expresión de CD4, CXCR4 y CCR5 en

la línea celular HUT se comprobó empleando anticuerpos monoclonales específicos para cada una de estas moléculas (Leu3a, 12G5 y 2D7 respectivamente, BD, Bioscience, San Diego, CA, USA). El resultado del ensayo se expresó como intensidad media de fluorescencia (IMF).

4.12. Determinación de alelos HLA clase I y HLA clase II

La determinación de los alelos HLA fue realizada empleando la metodología de tipificación de LIFECODES HLA-SSO basada en la amplificación de ADN por PCR-SSO (PCR con oligonucleótidos específicos de secuencia) y la posterior hibridación con sondas SSO del producto de PCR. Se realizó la determinación con un nivel de resolución mediano/alto para los locus de HLA clase I (A, B y C) y para los locus de HLA clase II (DRB y DQB) empleando el kit de tipificación LIFECODES HLA-SSO y la tecnología bead array (Gen-Probe, San Diego, CA, USA).

El ADN de los sujetos del estudio se adicionó a una concentración de 100 ng/mL en un volumen final de 50 μ L por reacción. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 8 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C y 45 segundos a 72°C, 32 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 63°C, 45 segundos a 72°C y finalmente un ciclo de 15 minutos a 72°C. Para cada ensayo se llevó a cabo un control negativo que consistió en agua y un control positivo que consistió en una muestra previamente tipificada.

Posteriormente, se realizó la hibridación empleando una placa para termociclador de 96 pocillos en los cuales se depositaron 5 μ L del producto de la PCR específica de

cada locus y 15 µL de la mezcla de sondas del kit de tipificación LIFECODES. Las condiciones para la hibridación fueron: 5 minutos a 97°C, 30 minutos a 47°C, 10 minutos a 56°C. La adquisición y análisis de las muestras se realizó empleando el analizador de flujo Luminex (Millipore, Corporation, Billerica, MA, USA).

4.13. Determinación de genes KIR

La determinación de los genes KIR fue realizada empleando la metodología de tipificación de LIFECODES KIR-SSO y la tecnología bead array (Gen-Probe, San Diego, CA, USA). Se determinó la presencia o ausencia de genes que codifican para los KIR inhibidores (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3) y activadores (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1, KIR2DL4).

El ADN se agregó a una concentración de 50 ng/mL en un volumen final de reacción de 20 µL. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 59°C, 30 segundos a 72°C y 1 ciclo final de 15 minutos a 72°C. Para cada ensayo se llevó a cabo un control negativo que consistió en agua y un control positivo que consistió en una muestra previamente tipificada.

Posteriormente se realizó la hibridación empleando una placa para termociclador de 96 pocillos en los cuales se depositaron 5 µL del producto de la PCR inicial y 15 µL de la mezcla de sondas del kit de tipificación LIFECODES. Las muestras se

hibridaron en el termociclador a 56°C por 20 minutos. La adquisición y análisis de las muestras se realizó empleando el analizador de flujo Luminex.

4.14. Determinación del polimorfismo rs12979860 cercano al gen de la *IL28B*

La determinación del SNP rs12979860 cercano al gen de la *IL28B* se realizó en muestras de ADN, empleando el ensayo 5' nucleasa y con sondas alelo-específicas TaqMan del kit ABI TaqMan allelic discrimination (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) empleando el termociclador de PCR a tiempo real m2000rt (Abbot, Illinois, USA).

La amplificación del ADN se llevó a cabo por PCR a tiempo real, empleando el cebador directo (5' GCCTGTCGTGTACTGAACCA 3') y el cebador inverso (5' GCGCGGAGTGCAATTCAAC 3') y sondas marcadas con los fluorocromos VIC (5' TGGTTCGCGCCTTC 3') y FAM (5' CTGGTTCACGCCTTC 3'). Para la reacción se emplearon placas de 96 pocillos y en cada uno de estos se agregó 12.5 µL de la mezcla de reacción, 0.625 µL de la mezcla de los cebadores y sondas, y 2 µL del ADN (1-2 ng/µL). Las condiciones de la reacción fueron: Un ciclo de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 92°C y finalmente un ciclo de 1 minuto a 60°C.

La interpretación de los resultados se realizó manualmente y se consideró el incremento en la fluorescencia de una de las sondas como homocigosidad para el alelo en cuestión y el incremento en la fluorescencia de ambas sondas como heterocigosidad. Para cada ensayo se llevó a cabo un control negativo que consistió en agua y tres controles positivos conformados por muestras previamente tipificadas

para el SNP rs12979860 (genotipo homocigoto CC, genotipo heterocigoto CT y genotipo homocigoto TT).

4.15. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el programa estadístico SPSS versión 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Todos los valores p se consideraron estadísticamente significativos cuando fueron inferiores a 0.05. Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov se comprobó que la mayoría de las variables estudiadas no seguían una distribución normal, por lo cual se decidió emplear pruebas no paramétricas para los distintos análisis realizados. Las características de la población de estudio y la descripción de las variables continuas analizadas se expresaron como mediana [rango intercuartílico]. Las comparaciones entre grupos para las distintas variables se realizaron empleando la prueba de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis, dependiendo del número de grupos a contrastar. Se empleó la prueba de Wilcoxon para las comparaciones de diferentes parámetros en el mismo grupo. La asociación entre las variables cualitativas se evaluó empleando la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher según correspondiera. Para evaluar los alelos HLA más fuertemente asociadas con el estatus HESN se realizó un análisis de regresión logística univariado y multivariado, obteniéndose en cada uno de ellos la odds ratio o cociente de probabilidades junto al intervalo de confianza del 95% y el correspondiente valor p.

5. Resultados

5.1 Características de la población estudiada

La **Tabla 7** resume las principales características del total de las 29 parejas heterosexuales serodiscordantes estudiadas. En el momento de la inclusión en el estudio, la mediana (rango intercuartílico, R.I) del recuento de linfocitos T CD4 para los miembros de las parejas que eran VIH+ fue de 441 (215-705) células/ μ L y la mediana del tiempo que llevaban infectados por el virus fue de 96 (24-180) meses. El 62% (18/29) de los pacientes VIH+ estaban recibiendo TARGA y tenían carga viral VIH indetectable (<50 copias/mL) y el 37% restantes (11/29) tenían una mediana de carga viral de 7532 (1580-23363) copias/mL.

Todos los individuos HESN (29/29) fueron VIH⁻ tras los análisis realizados mediante un ELISA. Trece de estos HESN eran hombres. La mediana del número de contactos sexuales con sus respectivas parejas fue de 8 (4-10) por mes y la mediana de la duración de la relación estable fue de 11 (4-17) años. El 55% (16/29) reportaron nunca haber utilizado preservativo en sus relaciones sexuales, el 27% (8/29) lo usaban esporádicamente, el 14% (4/29) lo usaban frecuentemente y el 3% (1/29) siempre lo usaba. Con esta información, sumada a la carga viral de sus respectivas parejas VIH+, los individuos HESN fueron clasificados en tres niveles de exposición: Un individuo HESN (3%) con un nivel de exposición al virus muy bajo, 18 (62%) con nivel de exposición bajo y 10 (35%) con nivel de exposición moderado-alto.

Tabla 7. Características clínicas y epidemiológicas de las parejas serodiscordantes incluidas en el estudio

Individuos expuestos seronegativos (HESN)								Pacientes VIH+					
Nº de pareja	Género	Edad (años)	ITS ^a	uso de preservativo ^b	Nº de contactos sexuales por mes ^c	Tiempo de relación estable (años)	Nivel de exposición ^d	Edad (años)	ITS ^a	Carga viral (copias/mL) ^e	Recuento de CD4 (células/ μ L) ^e	Tiempo en terapia antiretroviral (meses)	Tiempo de la infección por VIH desde el diagnóstico (meses)
1	F	30	No	F	4	11	Bajo	33	No	< 50	692	12	24
2	M	33	No	N	4	5	Moderado-alto	28	No	5061 (3004 – 7119)	509 (498-520)	0	108
3	M	48	No	N	8	14	Moderado-alto	38	Si	121792	17	0	156
4	F	35	Si	F	8	19	Moderado-alto	42	No	24262 (16281-26543)	452 (362 – 489)	0	144
5	F	40	No	E	3	16	Bajo	44	Si	< 50	652 (588 – 706)	72	96
6	M	47	No	N	8	18	Bajo	43	No	< 50	421	36	204
7	M	48	No	N	12	19	Bajo	46	No	< 50	224	24	216
8	F	32	No	N	8	1	Bajo	44	No	< 50	1716 (1271 – 1748)	12	36
10	M	38	No	E	16	2	Moderado-alto	25	Si	5153 (2723 – 6842)	157 (150 – 165)	0	12
11	F	38	No	E	4	6	Bajo	41	No	< 50	331 (312 – 351)	48	108
12	F	33	No	E	3	7	Bajo	32	No	< 50	152 (140 – 165)	36	24
13	F	35	No	N	8	20	Bajo	37	No	< 50	176	132	192
14	F	32	No	F	6	14	Bajo	33	No	< 50	NA	9	12
16	M	41	No	S	1	3	Muy bajo	38	No	< 50	466 (441 – 492)	12	72
17	F	43	No	N	4	16	Moderado-alto	45	No	706 (162 – 1250)	681 (657 – 705)	0	216
19	F	44	Si	N	8	2	Bajo	46	Si	< 50	741 (717 – 765)	36	252
20	M	32	No	N	12	3	Moderado-alto	40	No	68	1028	0	252
21	F	34	No	N	8	15	Bajo	40	Nd	< 50	525 (512 – 539)	0	48
22	F	39	No	F	12	23	Bajo	39	No	< 50	755 (667 – 843)	12	96
23	M	46	No	E	4	9	Bajo	46	Si	< 50	636 (579 – 694)	144	168
27	F	26	No	E	16	9	Moderado-alto	28	No	5153 (50 – 10256)	361	0	12
28	M	36	No	N	5	9	Bajo	47	Si	< 50	211	3	24
30	M	33	No	N	16	2	Moderado-alto	29	Si	7388 (2548 – 7528)	776 (705 – 848)	0	60
31	M	44	No	E	8	11	Bajo	44	No	<50	347	12	204
33	F	36	No	N	4	22	Bajo	43	No	< 50	NA	24	48
34	M	78	No	N	4	11	Bajo	34	Si	< 50	632	36	132
35	F	38	No	N	8	20	Bajo	37	No	<50	198	12	108
36	M	27	Si	E	8	6	Moderado-alto	28	Si	238131 (135182 - 155829)	692 (500 - 769)	0	12
37	F	25	No	N	12	1	Moderado-alto	35	Si	7532	215	0	12

ND: no disponible; **ITS:** infección de transmisión sexual.

^a Durante los últimos 12 meses antes de la inclusión en el estudio; ^b **F:** frecuente, **N:** nunca, **E:** esporádico, **S:** siempre; ^c Contacto sexual o anal; ^d Nivel de exposición: **Muy bajo** (uso de preservativo durante la relaciones sexuales, independientemente de la carga viral de su pareja VIH+; **Bajo** (uso esporádico de preservativo con su pareja VIH+ la cual tenía carga viral VIH indetectable <50 cop/mL), **Moderado-alto** (relaciones sexuales sin preservativo con su pareja VIH+ la cual tenía carga viral VIH detectable >50 cop/mL). ^e Mediana (rango intercuartílico) de valores durante los 12 meses previos a la inclusión, excepto en aquellos casos donde solo se disponía de una determinación.

Para el estudio sobre distribución de los alelos HLA clase I y clase II y de receptores KIR, se incluyeron además de los 29 individuos VIH+ pareja de los sujetos HESN, otros 32 pacientes VIH+, los cuales presentaban una mediana del recuento de células T CD4+ de 558 (400-800) células/ μ L. El 75% (24/32) tenían carga viral indetectable y el 25% (8/32) tenían una mediana de carga viral de 2177 (1038-22040) copias/mL en el momento de la inclusión en el estudio.

El 97% (148/152) de los individuos incluidos en este estudio eran de origen español y no hubo diferencias significativas en la composición racial entre los grupos estudiados (HESN, VIH+, controles no expuestos).

5.2. Características de la respuesta inmunológica específica frente al VIH, mediada por células T CD4+ y CD8+

Para caracterizar los aspectos cuantitativos y cualitativos de la respuesta específica frente al VIH mediada por las células T CD4+ y CD8+, se analizaron por citometría de flujo multiparamétrica distintos aspectos de esta respuesta como prevalencia, intensidad, amplitud y perfil funcional en 24 individuos HESN y sus parejas VIH+. Se consideró que la respuesta específica frente a los péptidos del VIH era positiva cuando los valores de producción IFN γ y/o MIP1 β por parte de las células T CD4+ y/o CD8+ estaba por encima de los diferentes valores de corte obtenidos para cada subpoblación celular estudiada basados en los datos obtenidos en el grupo de individuos sanos no expuestos al virus (ver **Tabla 5**).

5.2.1. Prevalencia, intensidad y amplitud de la respuesta inmunológica específica de células T CD4+ y CD8+ frente al VIH

El 54% (13/24) de los HESN estudiados y el 75% (18/24) de sus parejas VIH+ (75%) presentaron respuesta inmunológica detectable frente al VIH mediada por células T CD4+ y/o CD8+. De los 13 individuos HESN con respuesta detectable, el 23% (3/13) presentaron respuesta mediada únicamente por células T CD4+, el 23% (3/13) presentaron respuesta mediada solo por células T CD8+ y el 54% (7/13) presentaron respuesta mediada por ambas células (**Figura 11**).

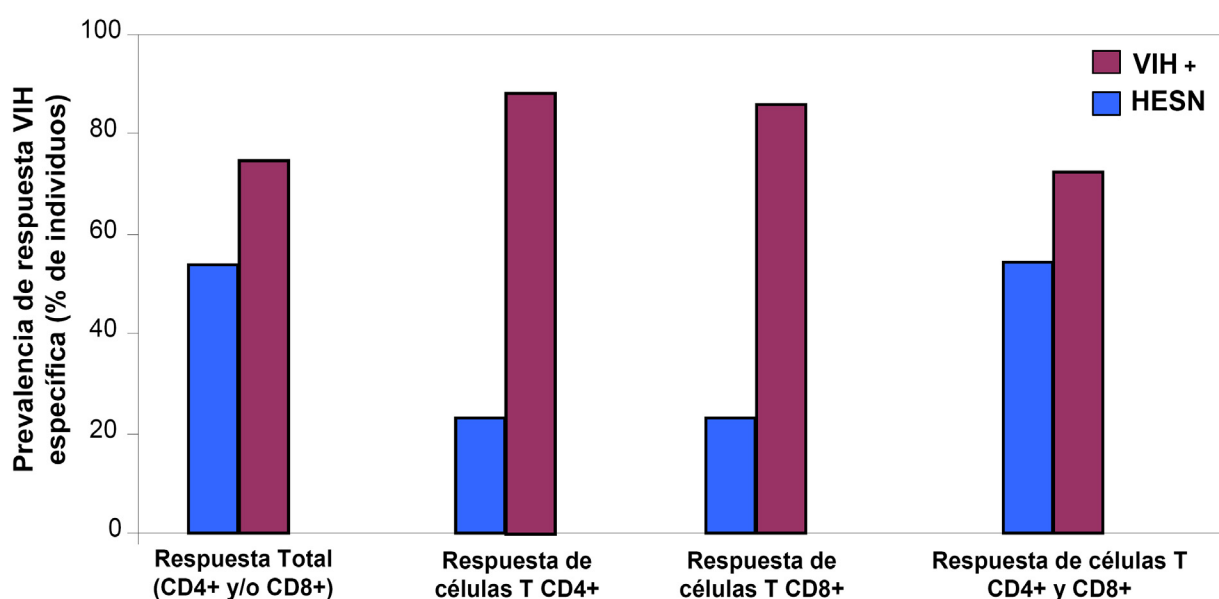


Figura 11. Prevalencia de respuesta frente al VIH mediada por células T CD4+ y CD8+ en individuos HESN y sus respectivas parejas VIH+

Cuando los 24 individuos HESN incluidos en este estudio, fueron clasificados de acuerdo al nivel de exposición al virus, la mayor prevalencia de respuesta mediada por las células T CD4+ y/o CD8+ se observó en los individuos con un bajo nivel de

exposición al virus (64%; 8/14) comparado con aquellos que presentaban un nivel de exposición al virus moderado-alto (33%; 3/9), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figura 12**). Sorprendentemente el único individuo HESN del grupo de exposición muy bajo, presentó también respuesta detectable de células T CD4+ y CD8+.

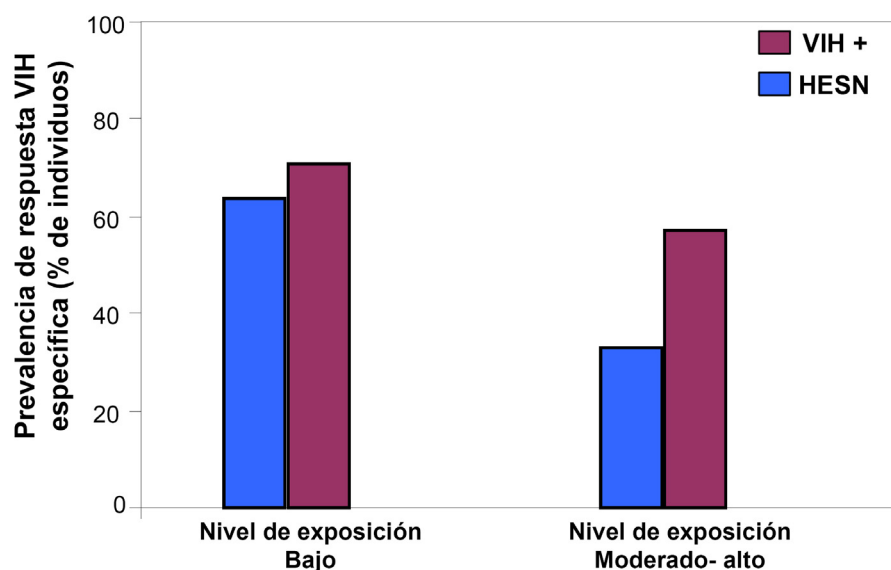


Figura 12. Prevalencia de respuesta VIH-específica mediada por células T CD4+ y/o CD8+ en los individuos HESN de acuerdo con el nivel de exposición al virus

La proporción de individuos HESN que presentaron respuesta mediada tanto por células T CD4+ como por células T CD8+, fue también mayor en aquellos individuos con un nivel bajo de exposición al virus (63%; 5/8) comparado con los que tenían un nivel de exposición moderado-alto (33%; 1/3).

Por otro lado, la proporción de individuos que mostraron respuesta de células T CD4+ y células T CD8+, varió de acuerdo con la proteína viral frente a la cual respondieron. En los individuos HESN, las proteínas Pol y Env fueron las más frecuentemente reconocidas por las células T CD4+ (22% y 26% de los individuos,

respectivamente), siendo Nef la proteína más frecuentemente reconocida por las células T CD8+ (26% de los individuos). En los pacientes VIH+, las proteínas mas frecuentemente reconocidas por las células T CD4+ fueron Gag y Nef (28% y 24% de los pacientes, respectivamente), mientras que las proteínas Gag y Pol fueron más frecuentemente reconocidas por las células T CD8+ (52% y 48% de los pacientes, respectivamente).

La intensidad de la respuesta global de las células T fue baja (<1%) en la mayoría (62%, 8/13) de los individuos HESN, aunque esto no fue así para cinco individuos (38%, 5/13), los cuales presentaron una intensidad de respuesta que osciló entre el 1% y el 4%. En general la intensidad de la respuesta mediada por las células T CD8+ fue mayor que la respuesta mediada por células T CD4+ en la mayoría de los sujetos HESN. En cuanto a las parejas VIH+, la intensidad de respuesta fue en general mayor que la observada en los individuos HESN (**Figura 13**).

Con respecto a la amplitud de respuesta, cuando se compararon los individuos HESN con los pacientes VIH+, no hubo diferencias significativas en el número de proteínas del VIH frente a las cuales hubo respuesta positiva de las células T CD4+ (3 [1-4] versus 2 [1-3], respectivamente) ni en el número de proteínas del VIH frente a las cuales hubo respuesta positiva mediada por las células T CD8+ (1 [1-7] versus 3 [1-7], respectivamente).

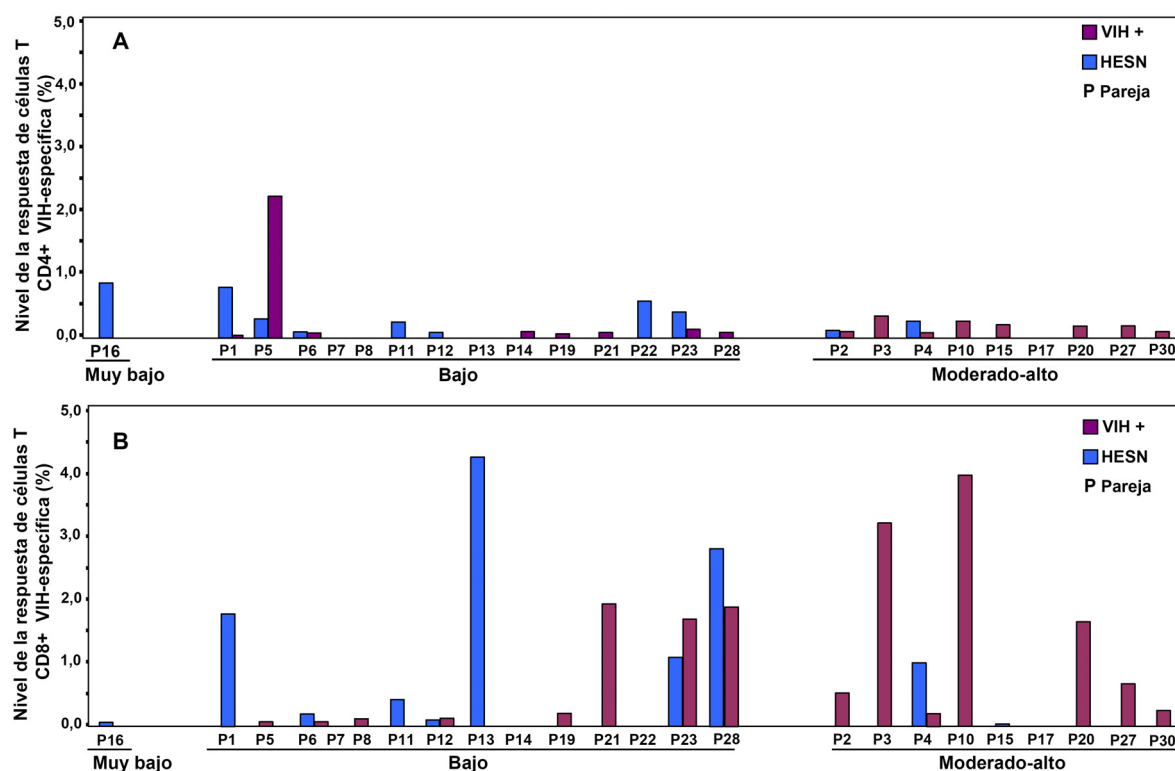


Figura 13. Nivel de respuesta de células T CD4+ (A) y CD8+ (B) específica frente al VIH en individuos HESN y sus respectivas parejas VIH+. Las parejas están agrupadas de acuerdo al nivel de exposición al virus (muy bajo, bajo y moderado-alto)

5.2.2. Perfil funcional de la respuesta inmunológica específica de células T CD4+ y CD8+ frente al VIH

Para determinar el perfil funcional de las células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH, se calculó la contribución de cada subpoblación funcional (células $MIP1\beta^{-}IFN\gamma^{+}$, $MIP1\beta^{+}IFN\gamma^{+}$ y $MIP1\beta^{+}IFN\gamma^{-}$) a la respuesta global de las células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH. Además se analizó la contribución de las subpoblaciones celulares monofuncionales (células que producían una sola citoquina: $MIP1\beta^{-}IFN\gamma^{+}$ ó

MIP1 β ⁺IFN γ ⁻) y subpoblaciones bi-funcionales (células que producían dos citoquinas: MIP1 β ⁺IFN γ ⁺), así como la contribución de subpoblaciones celulares que producían una citoquina en particular (MIP1 β ⁺ ó IFN γ ⁺).

La respuesta de las células T CD4⁺ fue mediada principalmente por la subpoblación MIP1 β ⁺IFN γ ⁺, tanto en individuos HESN como en sus parejas VIH⁺, con una menor contribución de las subpoblaciones celulares MIP1 β ⁺IFN γ ⁻ y MIP1 β ⁻IFN γ ⁺. Como consecuencia de esto, la respuesta de las células T CD4⁺ fue predominantemente mono-funcional y dominada por células productoras de IFN γ , tanto en individuos HESN como en sus parejas VIH⁺, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (**Figura 14**).

En cuanto al perfil funcional de las células T CD8⁺ VIH-específicas, se observó una contribución más equilibrada de las distintas subpoblaciones, especialmente en pacientes VIH⁺. La contribución de la subpoblación celular MIP1 β ⁺IFN γ ⁺ fue menor en los individuos HESN (0% [0-24]) comparado con los sujetos VIH⁺ (31% [6-69]) (p=0.08). Al igual que lo ocurrido con las células T CD4⁺, la respuesta de las células T CD8⁺ estuvo dominada principalmente por subpoblaciones celulares monofuncionales tanto en individuos HESN como en sus parejas VIH⁺. Sin embargo, en contraste con las células T CD4⁺, las subpoblaciones productoras de MIP1 β ⁺ y de IFN γ ⁺ contribuyeron de forma muy similar a la respuesta de células T CD8⁺. En los pacientes VIH⁺ la contribución de células T CD8⁺ productoras de MIP1 β ⁺ fue ligeramente superior que la de IFN γ ⁺, mientras que en los individuos HESN la contribución de las células T CD8⁺ productoras de MIP1 β o de IFN γ , fue prácticamente igual (**Figura 14**).

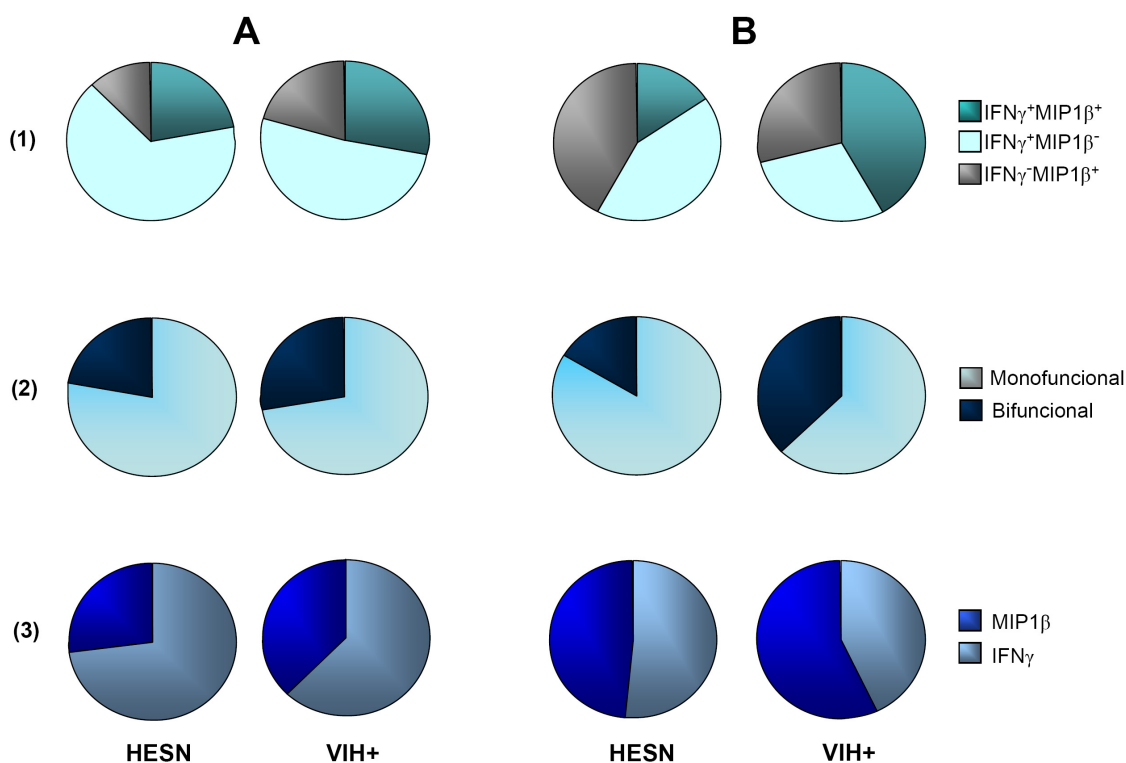


Figura 14. Perfil funcional de la respuesta de las células T CD4+ (A) y CD8+ (B) específicas del VIH, en individuos HESN y VIH+. Se muestra la media del porcentaje de contribución de las diferentes subpoblaciones celulares a la respuesta global de las células T CD4+ y CD8+. (1) Contribución de cada una de las subpoblaciones celulares excluyentes. (2) Contribución de las subpoblaciones mono y bi-funcionales. (3) Contribución de las subpoblaciones celulares que producen una citoquina en particular

5.3. Características de la respuesta mediada por las células T doble negativas (CD3⁺CD4⁻CD8⁻)

Para la caracterización de las células T doble negativas (DN), se examinó por citometría de flujo multiparamétrica su frecuencia y la respuesta de éstas células frente un estímulo policlonal y frente péptidos de la proteína Gag del VIH. Dada la limitación en el número de muestras de CMSP disponibles, este estudio se restringió

a 13 individuos HESN y sus parejas VIH+. Las parejas estudiadas en este apartado, están descritas en la **Tabla 7** (parejas 2,3,4,6,10,14,21,27,28,31,36,37,39). Se incluyó como grupo control a 35 sujetos seronegativos para el VIH no expuestos al virus.

5.3.1. Frecuencia de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$

Las células T DN representaron el 3.3% [2-4.5] del total de las células T CD3+ en los controles no expuestos, el 2.9% [2-3.4] en los individuos HESN y 3.6% [3-6] en los pacientes VIH+ ($p=0.2$) (**Figura 15**).

Las células T DN/ $\gamma\delta^+$ representaron el 2.1% [1.4-3.7] del total de las células T para los controles no expuestos, el 2.1% [1.6-3.0] para los individuos HESN y el 2.6% [1.7-4.6] para los pacientes VIH+, ($p=0.7$). En contraste, la proporción de células T DN/ $\alpha\beta^+$ fue significativamente más alta en los pacientes VIH+ (1.0% [0.7-1.2]) que en los HESN (0.4% [0.2-0.5]) y los controles no expuestos (0.5% [0.3-0.7]), ($p<0.0001$) (**Figura 15**).

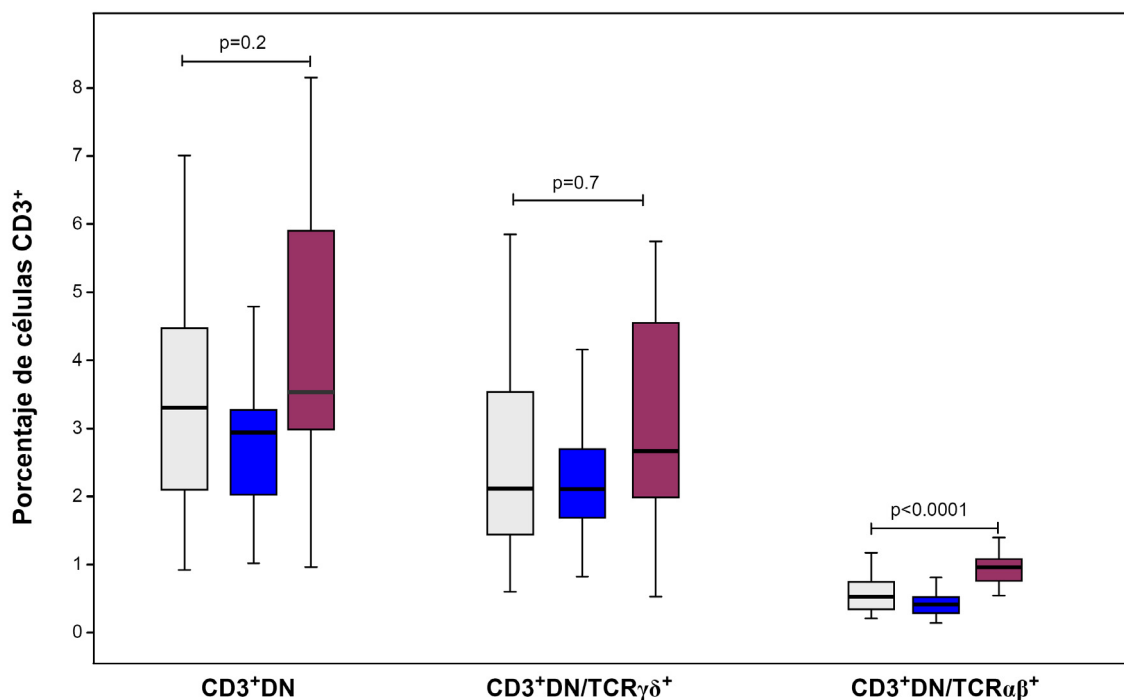


Figura 15. Frecuencia de todas las células T DN ($CD3^+CD4^-CD8^-$), las $DN/\gamma\delta^+$ y las $DN/\alpha\beta^+$ en controles no expuestos, individuos HESN y pacientes VIH+. Las diferencias entre grupos fueron determinadas empleando el test no paramétrico Kruskal-Wallis

5.3.2. Características de la respuesta de las células T DN frente a un estímulo policlonal

La producción de $MIP1\beta$ y/o $IFN\gamma$ por las células T $DN/\gamma\delta^+$ y $DN/\alpha\beta^+$ se determinó tras estimulación policlonal con PMA/Ionomicina. El nivel de respuesta de las células T $DN/\gamma\delta^+$ fue mayor en pacientes VIH+ (70% [61-85]) comparado con individuos HESN (53% [14-74]) y con controles no expuestos (39% [27-54]) ($p<0.0001$). Las células T $DN/\gamma\delta^+$ de los individuos HESN tuvieron niveles de producción de citoquinas ligeramente mayores que las de los controles no expuestos aunque las diferencias

no alcanzaron a ser estadísticamente significativas. Con respecto al nivel de respuesta de las células T DN/ $\alpha\beta^+$, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de sujetos (**Figura 16**).

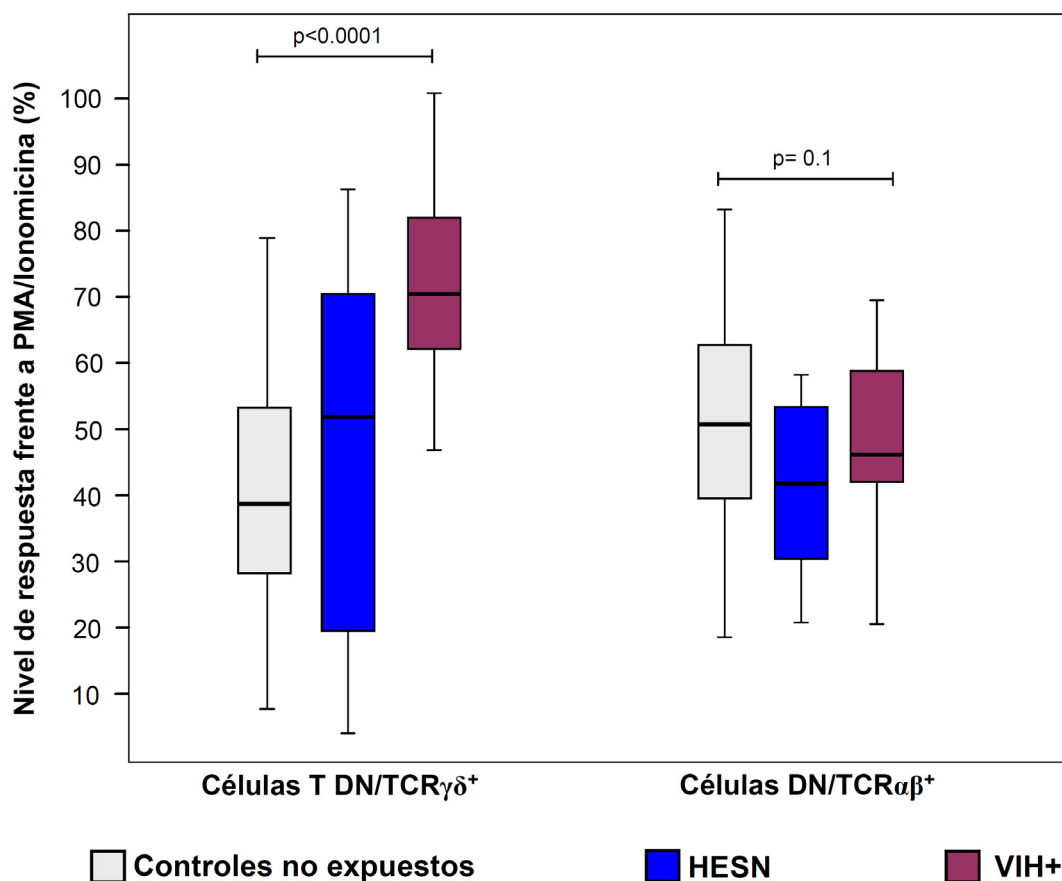


Figura 16. Nivel de respuesta de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$ frente al estímulo policlonal (PMA/Ionomicina) en controles no expuestos, individuos HESN y pacientes VIH+. Las diferencias entre grupos fueron determinadas empleando el test no paramétrico Kruskal-Wallis

Para la determinación del perfil funcional de la respuesta de las células T DN frente al estímulo policlonal, se calculó la contribución de cada una de las subpoblaciones celulares excluyentes (MIP1 β^- IFN γ^+ , MIP1 β^+ IFN γ^+ y MIP1 β^+ IFN γ^-) a la respuesta

global de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$. Se calculó además la contribución de las subpoblaciones celulares productoras de una sola citoquina o monofuncionales (MIP1 β^- IFN γ^+ y MIP1 β^+ IFN γ^-), las subpoblaciones bi-funcionales (MIP1 β^+ IFN γ^+) y la contribución de las subpoblaciones celulares que producen una citoquina en particular (MIP1 β^+ ó IFN γ^+).

La respuesta de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ frente al estímulo policlonal estuvo mediada principalmente por la subpoblación celular bi-funcional MIP1 β^+ IFN γ^+ en todos los grupos (controles no expuestos, HESN, VIH+), aunque la contribución de esta subpoblación fue mayor en los individuos VIH+ (80% [69-83]), comparado con los HESN (64% [40-78]) y con los controles no expuestos (55% [46-64]), ($p=0.001$) Como consecuencia del predominio de la subpoblación MIP1 β^+ IFN γ^+ , ambas citoquinas contribuyeron de manera similar a la respuesta de las células T DN/ $\gamma\delta^+$, en todos los grupos de sujetos (**Figura 17**).

También la respuesta de las células T DN/ $\alpha\beta^+$ frente al estímulo policlonal, estuvo mediada principalmente por la subpoblación celular bi-funcional MIP1 β^+ IFN γ^+ en todos los grupos estudiados y no hubo diferencias significativas entre estos: 85% [78-88] para los VIH+, 81% [64-84] para los individuos HESN y 84% [68-90] para los controles no expuestos, ($p=0.4$). Como consecuencia del predominio de la subpoblación MIP1 β^+ IFN γ^+ , el nivel de contribución fue similar para ambas citoquinas en los tres grupos de sujetos (**Figura 17**).

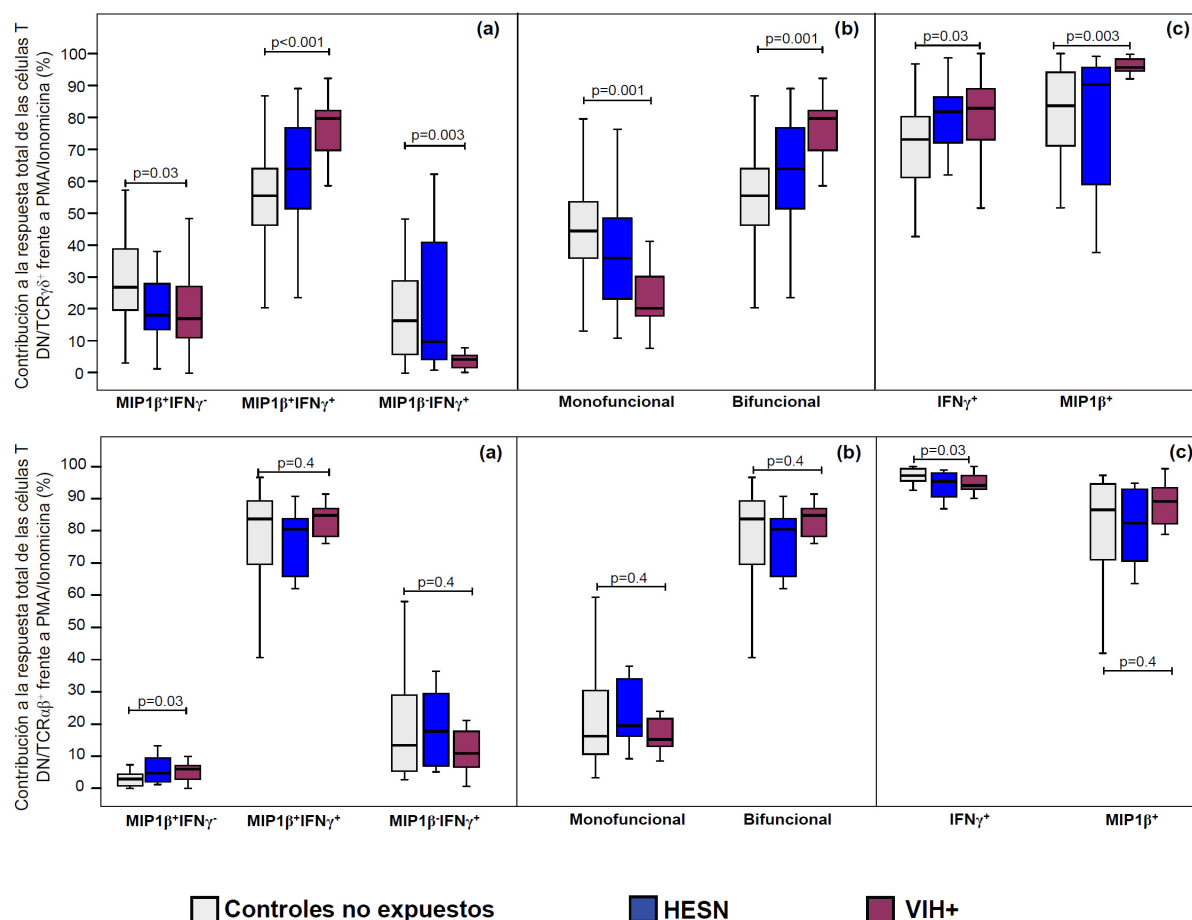


Figura 17. Porcentaje de contribución de las diferentes subpoblaciones funcionales al total de la respuesta mediada por las células T DN/γδ⁺ (gráfico superior) y DN/αβ⁺ (gráfico inferior) frente a PMA/Ionomicina, en controles no expuestos, individuos HESN y pacientes VIH+. **(a)** Contribución de cada subpoblación excluyente, **(b)** Contribución de las subpoblaciones mono y bi-funcionales, **(c)** Contribución de las células productoras de una citoquina en particular. Las comparaciones entre grupos se hicieron con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis

5.3.3. Características de la respuesta específica de las células T DN frente a la proteína Gag del VIH

La respuesta específica frente a Gag de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$ en los individuos HESN y los pacientes VIH+, se consideró positiva cuando se cumplían los siguientes criterios: 1) que la respuesta estuviera por encima del valor umbral establecido como cociente a partir de los datos obtenidos en el grupo de controles no expuestos (ver **Tabla 6**); 2) que el porcentaje de células positivas (productoras de alguna citoquina) fuera superior al 0.1% después de restar el valor obtenido en el control negativo del experimento.

En un 23% (3/13) de los HESN estudiados se observó respuesta detectable de las células T DN específicas de Gag. Dos de estos individuos mostraron respuesta mediada por las células T DN/ $\alpha\beta^+$ y uno mediada tanto por células T DN/ $\alpha\beta^+$ como por células T DN/ $\gamma\delta^+$. El 30% (4/13) de los pacientes VIH+, mostraron respuesta detectable de las células T DN específicas frente a Gag, pero en contraste con lo observado en los individuos HESN, esta respuesta estuvo mediada únicamente por las células T DN/ $\gamma\delta^+$ en los cuatro pacientes (**Tabla 8**).

La intensidad de la respuesta mediada por las células T DN/ $\gamma\delta^+$, presente en un solo individuo HESN, fue del 0.84%, mientras que en todos los pacientes VIH+ que presentaron esta respuesta fue menor del 0.5%. Con respecto a la respuesta mediada por las células T DN/ $\alpha\beta^+$, la intensidad de la respuesta en los 3 HESN que mostraron dicha respuesta, osciló entre el 0.4% y el 2.0% (**Tabla 8**).

Tabla 8. Respuesta global de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$ frente a la proteína Gag del VIH

A. Respuesta de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ Gag-específicas

Estímulo con el grupo Gag1								Estímulo con el grupo Gag2					
		Células MIP1 β^+ IFN γ^-		Células MIP1 β^+ IFN γ^+		Células MIP1 β^+ IFN γ^+		Células MIP1 β^+ IFN γ^-		Células MIP1 β^+ IFN γ^+		Células MIP1 β^+ IFN γ^+	
Grupo	Pareja N°	%	Ratio*	%	Ratio*	%	Ratio*	%	Ratio*	%	Ratio*	%	Ratio*
HESN	3	0.15	1.6	0.06	7	0.33	5.71	0.02	1.08	0.01	2	0.51	8.29
VIH+	2	0.03	1.1	0	0	0.22	5.4	0.08	1.43	0	0	0.13	3.6
VIH+	27	0	1	0.01	2	0.12	5	0	0.44	0	0	0.05	2.67
VIH+	31	0	0.7	0.01	2	0.12	5	0	0.88	0.01	2	0.09	4
VIH+	37	0	0.1	0.04	0.2	0.43	4	0	0.14	0	0.4	0.31	3.21

B. Respuesta de las células T DN/ $\alpha\beta^+$ Gag-específicas

Estímulo con el grupo Gag1								Estímulo con el grupo Gag2					
		Células MIP1 β^+ IFN γ^-		Células MIP1 β^+ IFN γ^+		Células MIP1 β^+ IFN γ^+		Células MIP1 β^+ IFN γ^-		Células MIP1 β^+ IFN γ^+		Células MIP1 β^+ IFN γ^+	
Grupo	Pareja N°	%	Ratio*	%	Ratio*	%	Ratio*	%	Ratio*	%	Ratio*	%	Ratio*
HESN	3	0	0.41	0.03	1.5	2.03	6.21	0	0.77	0	0	1.35	4.46
HESN	4	0	0.53	0.09	3.2	0.67	3.58	0	0.47	0.05	2	1.8	8.35
HESN	37	0	0.64	0.19	7.33	0.33	2.1	0.02	1.18	0.43	15.3	0.6	3

%: valor absoluto de respuesta (después de restar el valor obtenido en el control negativo no estimulado); * cociente entre el nivel de respuesta para cada subpoblación funcional en presencia y en ausencia de estimulación con péptidos de Gag. Las respuestas que fueron consideradas positivas están resaltadas en gris.

5.3.4. Perfil funcional de la respuesta de células T DN/ $\gamma\delta^+$ y DN/ $\alpha\beta^+$ específicas frente a Gag

La respuesta de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ estuvo mediada únicamente por la subpoblación de células MIP1 β^+ IFN γ^+ en todos los pacientes VIH+ y como consecuencia la respuesta de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ en estos individuos fue monofuncional y dominada por subpoblaciones productoras de IFN γ^+ . Resultados similares se observaron en el sujeto HESN que presentó respuesta detectable de células T DN/ $\gamma\delta^+$ (Tabla 9).

La respuesta de las células T DN/ $\alpha\beta^+$ presente en los 3 individuos HESN fue mediada por la subpoblación celular MIP1 β^+ IFN γ^+ en dos de ellos y por la subpoblación de células MIP1 β^+ IFN γ^+ en el otro sujeto (**Tabla 9**).

Tabla 9. Perfil funcional de la respuesta de las células T DN Gag específicas

A. Perfil funcional de la respuesta de las células DN/TCR $\gamma\delta^+$ Gag-específicas

Grupo	Pareja N°	Porcentaje de contribución a la respuesta Gag-específica						
		Por sub-población excluyente (%)			Por número de funciones (%)		Por citoquina (%)	
		MIP1 β^+ IFN γ^-	MIP1 β^+ IFN γ^+	MIP1 β^- IFN γ^+	Monofuncional	Bifuncional	MIP1- β	IFN- γ
HESN	3	0	0	100	100	0	0	100
VIH+	2	0	0	100	100	0	0	100
VIH+	27	0	0	100	100	0	0	100
VIH+	31	0	0	100	100	0	0	100
VIH+	37	0	0	100	100	0	0	100

B. Perfil funcional de la respuesta de las células DN/TCR $\alpha\beta^+$ Gag-específicas

Grupo	Pareja N°	Porcentaje de contribución a la respuesta Gag-específica						
		Por sub-población excluyente (%)			Por número de funciones (%)		Por citoquina (%)	
		MIP1 β^+ IFN γ^-	MIP1 β^+ IFN γ^+	MIP1 β^- IFN γ^+	Monofuncional	Bifuncional	MIP1- β	IFN- γ
HESN	3	0	0	100	100	0	0	100
HESN	4	0	0	100	100	0	0	100
HESN	37	0	100	0	0	100	100	100

5.4. Estado de maduración y activación de las células T CD4+ y CD8+

Se examinó el estado de maduración de las células T CD4+ y CD8+ (empleando los marcadores CD45RA y CD27) y el estado de activación (empleando los marcadores HLA-DR y CD38) de las diferentes subpoblaciones de las células T CD4+ y CD8+ en 18 parejas serodiscordantes y 20 controles no expuestos.

Como era de esperar, se observaron diferentes alteraciones en la distribución de algunas subpoblaciones de las células T en los individuos VIH+ comparado con los individuos HESN y con los controles no expuestos. Estas alteraciones incluyeron

bajos niveles de células T CD8+ naïve (CD45RA+CD27+) ($p=0.02$) y niveles incrementados de células T CD8+ memoria central (MC, CD45RA-CD27+) ($p=0.05$). Además se observaron niveles de activación incrementados en las células T CD8+ MC, ($p=0.03$) y en las células T CD8+ memoria efectoras (ME, CD45RA-CD27-), ($p=0.017$).

En cuanto a los individuos HESN, mostraron un porcentaje elevado de linfocitos T CD4+CD38+ ($p=0.006$), CD4+HLADR-CD38+ ($p=0.05$) y CD4+ naïve HLADR-CD38+ ($p=0.006$) comparado con los controles no expuestos. Se observó también un incremento significativo de células T CD8+ naïve HLADR+CD38- ($p=0.0001$) y CD8+ efectoras HLADR+CD38+ ($p=0.004$) en los sujetos HESN comparados con los controles no expuestos (**Figura 18**).

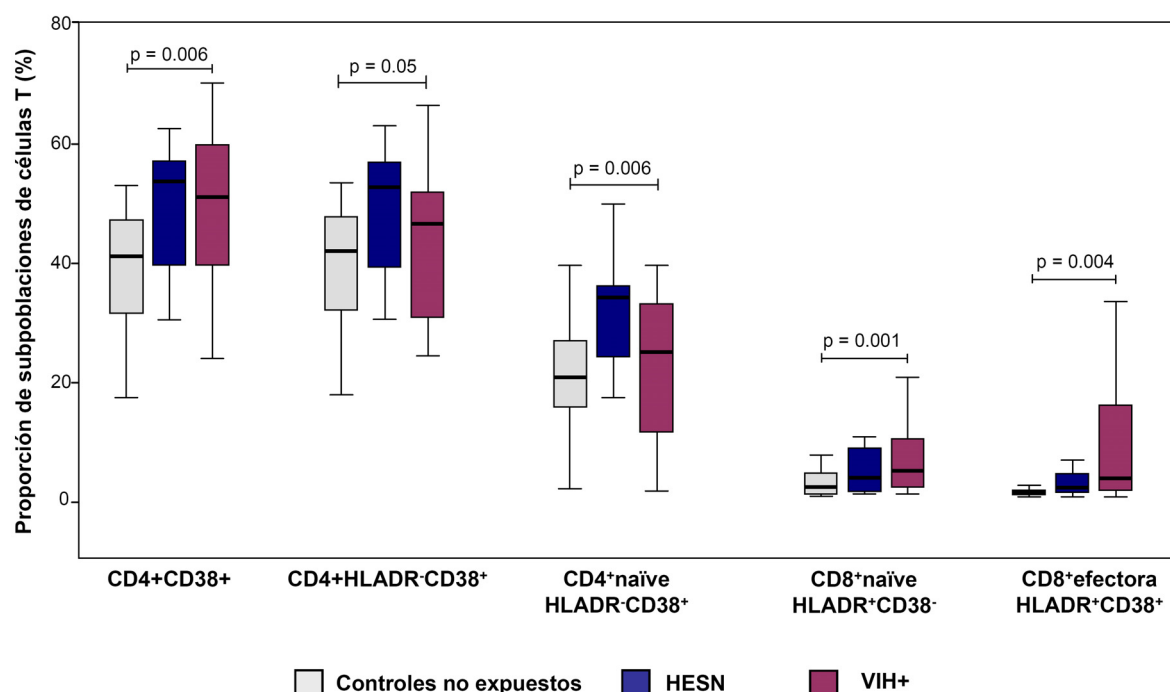


Figura 18. Niveles de activación de diversas subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+ en controles no expuestos, individuos HESN y sujetos VIH+

Asociación de los niveles de activación con la presencia de respuesta de las células T CD4+ y/o CD8+ específicas del VIH. Para evaluar la asociación de la respuesta específica frente al VIH mediada por las células T CD4+ y/o CD8+ con las alteraciones observadas en las diversas subpoblaciones de células T, se estratificaron los individuos HESN de acuerdo a la presencia o ausencia de respuesta de las células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH. De los 18 individuos de los cuales disponíamos de información sobre el estado de maduración y activación de las células T, 10 habían presentado respuesta específica detectable frente al VIH mediada por las células T CD4+ y/o CD8+. En estos 10 individuos, se observó una menor proporción de células T CD8+ naïve ($p=0.02$) y una mayor proporción de células T CD8+ efectoras ($p=0.0001$) cuando se compararon con los 8 individuos HESN que no presentaron respuesta celular VIH específica detectable. Con respecto a los niveles de activación, se observaron niveles significativamente elevados de células T CD8+ HLADR+CD38+ ($p=0.04$), CD8+ efectoras HLADR+CD38- ($p=0.03$), memoria central HLADR+CD38- ($p=0.03$), memoria efectoras HLADR+CD38- ($p=0.08$) y naïve HLADR+CD38+ ($p=0.05$) en los individuos HESN que presentaron respuesta celular específica del VIH, comparados con aquellos que no tuvieron dicha respuesta (**Figura 19**).

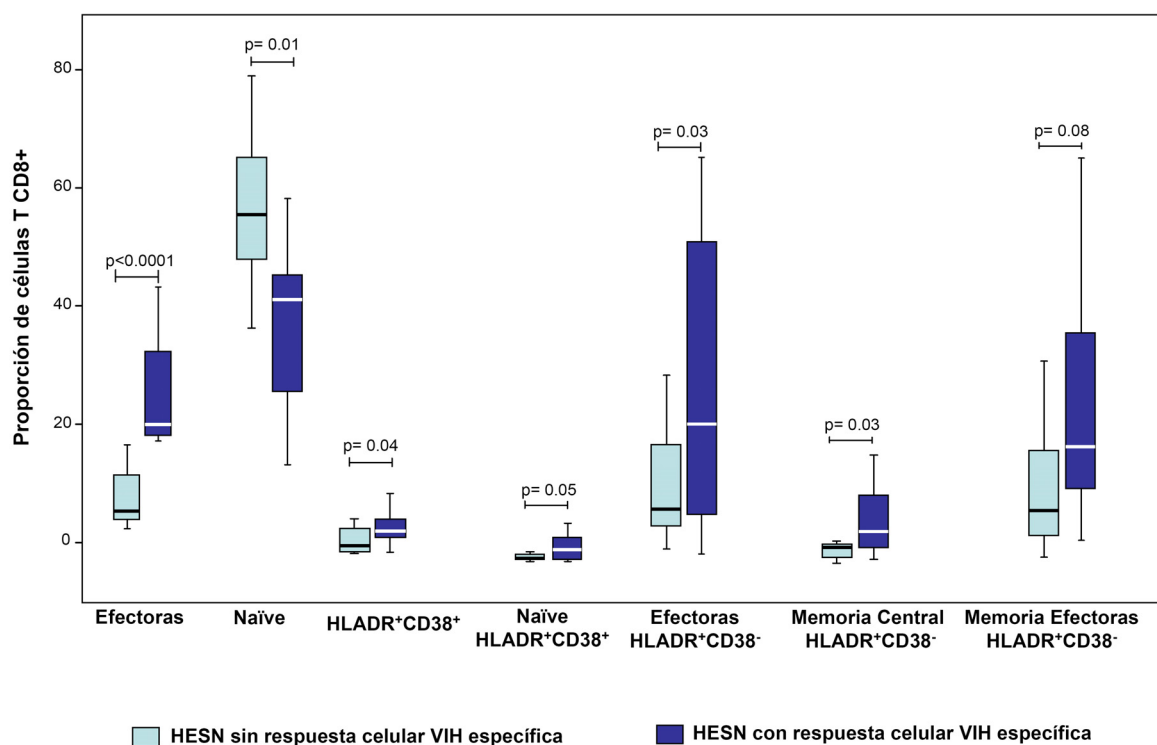


Figura 19. Niveles de diferentes subpoblaciones de células T CD8+ en los individuos HESN de acuerdo a la presencia o ausencia de respuesta celular VIH específica

Con respecto a las células T CD4+, en general no hubo diferencias significativas entre los individuos HESN con y sin respuesta celular VIH específica detectable para ninguna de las subpoblaciones evaluadas. Sin embargo, se observó un alto porcentaje de células T CD4+CD38+ ($p=0.03$) así como un incremento significativo en el porcentaje de células T CD4+ naïve HLADR-CD38+ ($p=0.01$) en los individuos HESN con respuesta celular VIH específica detectable comparados con los controles no expuestos.

5.5. Características de la respuesta humoral específica frente al VIH

5.5.1. Actividad Neutralizante

La capacidad neutralizante de los individuos VIH+, HESN y controles no expuestos fue analizada mediante un ensayo estandarizado empleando tres aislados del VIH diferentes (NL4-3, BaL y AC10). La actividad neutralizante se consideró positiva cuando el nivel de inhibición de la infección era superior al 50%.

El 11% (3/27) de los individuos HESN evaluados presentaron actividad neutralizante positiva frente a alguno de los aislados virales empleados. Tres individuos HESN mostraron actividad neutralizante frente al aislado BaL y uno de ellos también frente al aislado NL4-3. Ninguno de los plasmas de los HESN evaluados, mostraron actividad neutralizante frente al aislado AC10 (**Figura 20**).

La mayoría de los individuos VIH+ (60%, 16/27) mostraron actividad neutralizante y a niveles significativamente mayores que los HESN, aunque en algunos casos ésta neutralización fue muy baja o indetectable en algunos de ellos principalmente frente al aislado AC10. Como era de esperar, los controles no expuestos al VIH, no mostraron actividad neutralizante frente a ningún aislado viral (**Figura 20**).

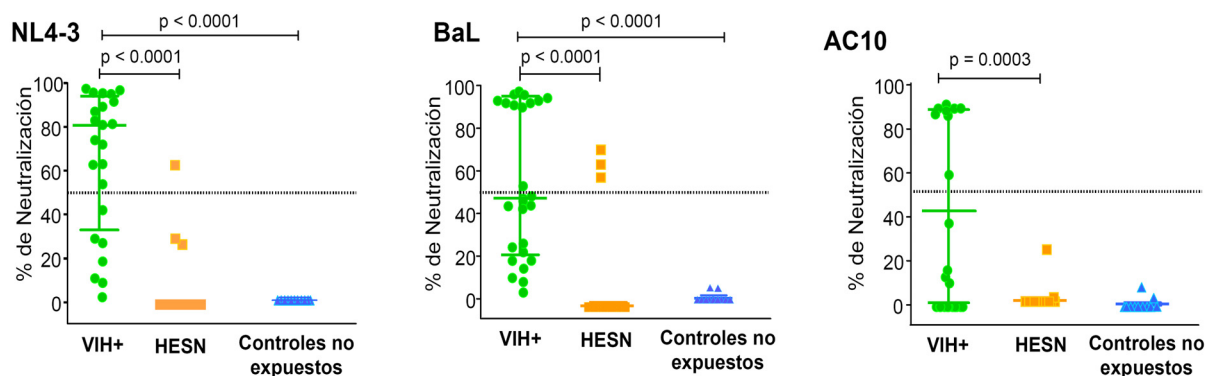


Figura 20. Niveles de Neutralización frente a los diferentes aislados del VIH NL4-3, BaL, AC10 en individuos VIH+, HESN y controles no expuestos, la línea punteada indica el valor de corte (50% de inhibición)

5.5.2. Reconocimiento de la envuelta viral

Se desarrolló un ensayo por citometría de flujo para determinar la presencia de anticuerpos IgG e IgA capaces de reconocer la envuelta nativa del VIH (expresada en la superficie celular), empleando la línea celular MOLT, la cual se infectó con los aislados del VIH NL4-3 y BaL. Los resultados se expresaron como porcentaje de células MOLT positivas tras la incubación con el plasma de cada individuo.

Los plasmas de los individuos HESN mostraron niveles muy bajos de reconocimiento de envuelta del aislado NL4-3 y similares a los de controles no expuestos. Sin embargo, frente al aislado BaL, los sujetos HESN mostraron niveles de reconocimiento significativamente más altos que los observados en los controles no expuestos ($p=0.006$ para IgG y $p=0.01$ para IgA), aunque significativamente más bajos que los observados en los pacientes VIH+ ($p=0.001$ para IgG) (**Figura 21**).

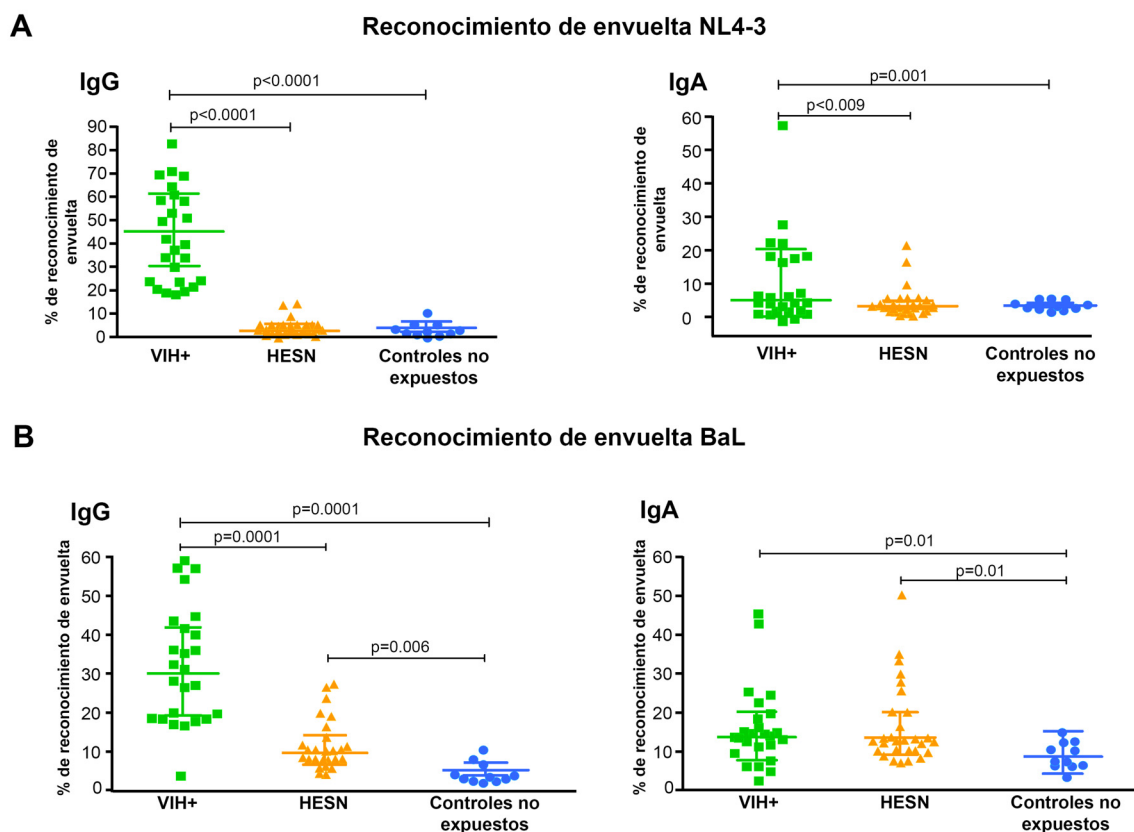


Figura 21. Niveles de reactividad de los anticuerpos IgG e IgA frente a la envuelta de los aislados virales NL4-3 (**A**) y BaL (**B**) de los individuos VIH+, HESN y controles no expuestos

Curiosamente, hubo una falta de asociación entre la presencia de anticuerpos reactivos frente a la envuelta y la actividad neutralizante en los HESN, ya que el nivel de reactividad frente a la envuelta de los dos aislados (BaL y NL4-3) en los 3 sujetos HESN que mostraron actividad neutralizante no fue mayor que el observado en los sujetos HESN que no mostraron actividad neutralizante. Hay que destacar que esta falta de asociación también se observó en los pacientes VIH+ (**Figura 22**).

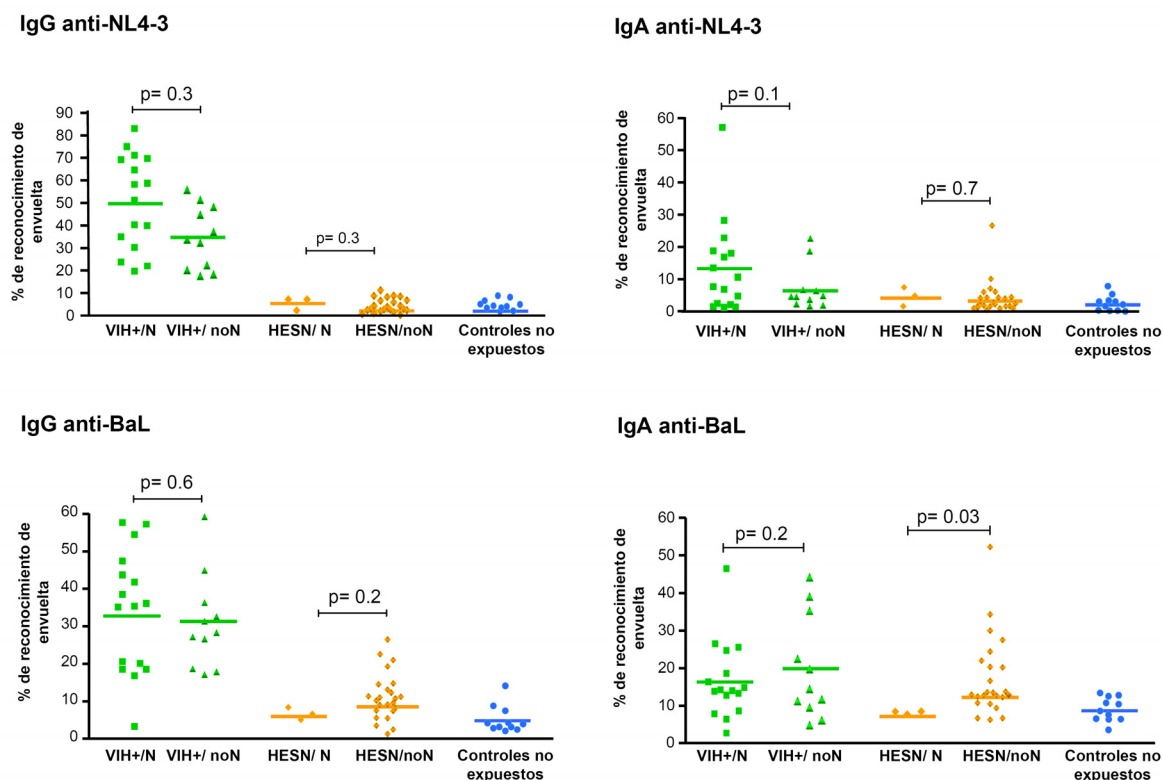


Figura 22. Reactividad de anticuerpos IgG e IgA frente a la envuelta de los aislados NL4-3 (gráficos superiores) y BaL (gráficos inferiores) en individuos VIH+ y HESN de acuerdo con la presencia (VIH+/N, HESN/N) o ausencia (VIH+/noN, HESN/noN) de actividad neutralizante

Como otro abordaje de este estudio, el reconocimiento específico de la envuelta fue considerado positivo cuando los valores de reactividad frente a envuelta por los anticuerpos IgG o IgA, estuvieron por encima de los valores de corte establecidos en los controles no expuestos y definidos como la media de los valores obtenidos en los controles no expuestos más dos desviaciones estándar. Empleando esta aproximación, se observó que el 30% de los individuos HESN (8/27) mostraron reactividad de IgG contra la envuelta del aislado BaL, mientras que solo el 8% (2/27) mostraron reactividad IgG frente a NL4-3. La reactividad de IgA frente a la envuelta

de BaL fue del 26% (7/27) y frente a NL4-3 fue del 15% (4/27) de los individuos HESN. Agrupando estos resultados, se observó que 14 de los 27 individuos HESN (52%) mostraron reactividad de IgG o IgA frente a la envuelta nativa de al menos uno de los aislados. Solo uno de los individuos HESN mostró reactividad mediada por ambos anticuerpos frente a los aislados NL4-3 y BaL.

Dado que existen epítomos de la envuelta que están enmascarados y solo son accesibles al reconocimiento por anticuerpos tras la unión con la molécula CD4 (también llamados epítomos inducidos por el CD4 o epítomos crípticos), se realizó un estudio para poder determinar anticuerpos capaces de reconocer este tipo de epítomos. Para esto, se modificó la técnica empleada para la detección de anticuerpos reactivos frente a la envuelta nativa, añadiendo la molécula CD4s al cultivo con la línea celular MOLT antes de adicionar los plasmas diluidos de los sujetos del estudio. Este ensayo se realizó únicamente en sujetos HESN y controles no expuestos.

Para cada muestra del estudio se calculó la diferencia entre el porcentaje de reconocimiento de la envuelta tras la adición de CD4s y el porcentaje de reconocimiento obtenido con la técnica original sin CD4s. Se observó, que tras la adición de la molécula CD4s hubo un incremento en la reactividad de IgG frente a la envuelta viral de los aislados BaL y NL4-3 en los sujetos HESN comparado con los controles no expuestos ($p=0.0005$ y $p=0.0003$, respectivamente) (**Figura 23**), mientras que el incremento en la reactividad mediada por la IgA tras la adición de CD4s no fue estadísticamente significativo. Empleando un punto de corte definido como la media más dos desviaciones estándar de los valores obtenidos en los

controles no expuestos, encontramos que 8 de los 27 HESN (30%) presentaron un incremento significativo de reactividad frente al aislado NL4-3 y 13/27 (48%) frente al aislado BaL.

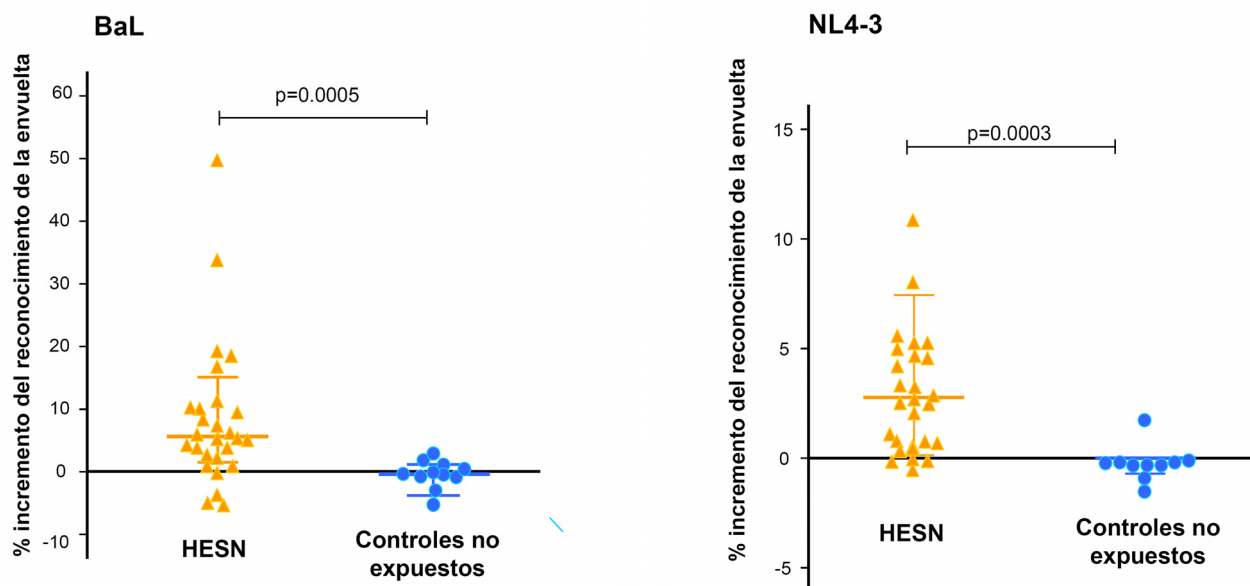


Figura 23. Niveles de incremento en el reconocimiento de la envuelta viral tras la adición de CD4s al cultivo, en individuos HESN y en controles no expuestos

Considerando las dos técnicas (con y sin la adición de CD4s) conjuntamente, se observó que el 85% (23/27) de los sujetos HESN mostraron algún reconocimiento de envuelta mediado por IgG o IgA. Con lo cual, el reconocimiento de envuelta incrementó de un 52% (técnica sin CD4s) a un 85% (ambas técnicas) de los individuos. Hay que destacar que 9 de los 13 sujetos HESN (69%) que no habían presentado reconocimiento de la envuelta nativa de BaL o NL4-3, sí fueron capaces de reconocer epítomos crípticos de la envuelta. Estos datos confirman la presencia de respuesta humoral específica frente al VIH en la mayoría de individuos HESN.

Asociación del reconocimiento de la envuelta del VIH con el nivel de exposición al VIH y la respuesta mediada por las células T CD4+ y CD8+.

Cuando los individuos HESN fueron estratificados de acuerdo con el nivel de exposición al VIH (muy bajo, bajo y moderado-alto) la prevalencia de reactividad frente a la envuelta de los aislados NL4-3 y BaL fue similar en los individuos HESN con nivel de exposición bajo (82% [14/17]) y moderado-alto (88% [8/9]). Curiosamente, el único individuo perteneciente al nivel de exposición muy bajo, presentó reactividad frente a la envuelta y esta fue mediada solo por la IgA.

De los 27 individuos HESN incluidos en este estudio, a 23 se les había determinado además la respuesta de células T CD4+ y CD8+ frente al VIH. Se analizó la existencia de asociación entre presentar reconocimiento de envuelta y presentar respuesta de células T. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre ambos parámetros ($p=0.5$) (**Tabla 9**).

Tabla 9. Asociación entre el reconocimiento de la envuelta viral y la existencia de respuesta mediada por células T CD4+ y CD8+ en individuos HESN

		Reconocimiento de envuelta		Valor p
		SI	NO	
Respuesta de células T CD4+ y CD8+	SI	92% (12)	8% (1)	0,5
	NO	80% (8)	20% (2)	

5.5.3 Reconocimiento de moléculas de la membrana celular (CD4, CCR5 y CXCR4) involucradas en la entrada del VIH

Para determinar si la presencia de autoanticuerpos capaces de reconocer las moléculas involucradas en la entrada del VIH (CD4, CCR5 y CXCR4), podría ser la causante de la actividad neutralizante existente en algunos de los individuos HESN, se analizó el nivel de reactividad en plasma frente a estas moléculas empleando la línea celular HUT la cual expresa en su membrana los receptores CD4, CCR5 y CXCR4. En general, los individuos HESN no tuvieron un mayor reconocimiento de los receptores de membrana comparado con los individuos VIH+ y con los controles sanos. De hecho, estos últimos mostraron un nivel incrementado de reactividad mediada por la IgA frente a estos receptores celulares cuando se compararon con los individuos HESN y los VIH+ (**Figura 24 A**).

Para evaluar la asociación de la capacidad neutralizante presente en algunos individuos VIH+ y HESN con la reactividad frente a los receptores de membrana CD4, CCR5 y CXCR4, estratificamos los grupos de estudio de acuerdo a la existencia de capacidad neutralizante frente al VIH y observamos que los niveles de reactividad frente a las moléculas CD4, CCR5 y CXCR4 no fueron mayores en los sujetos HESN que mostraron actividad neutralizante comparados con los que no la presentaron (**Figura 24 B**).

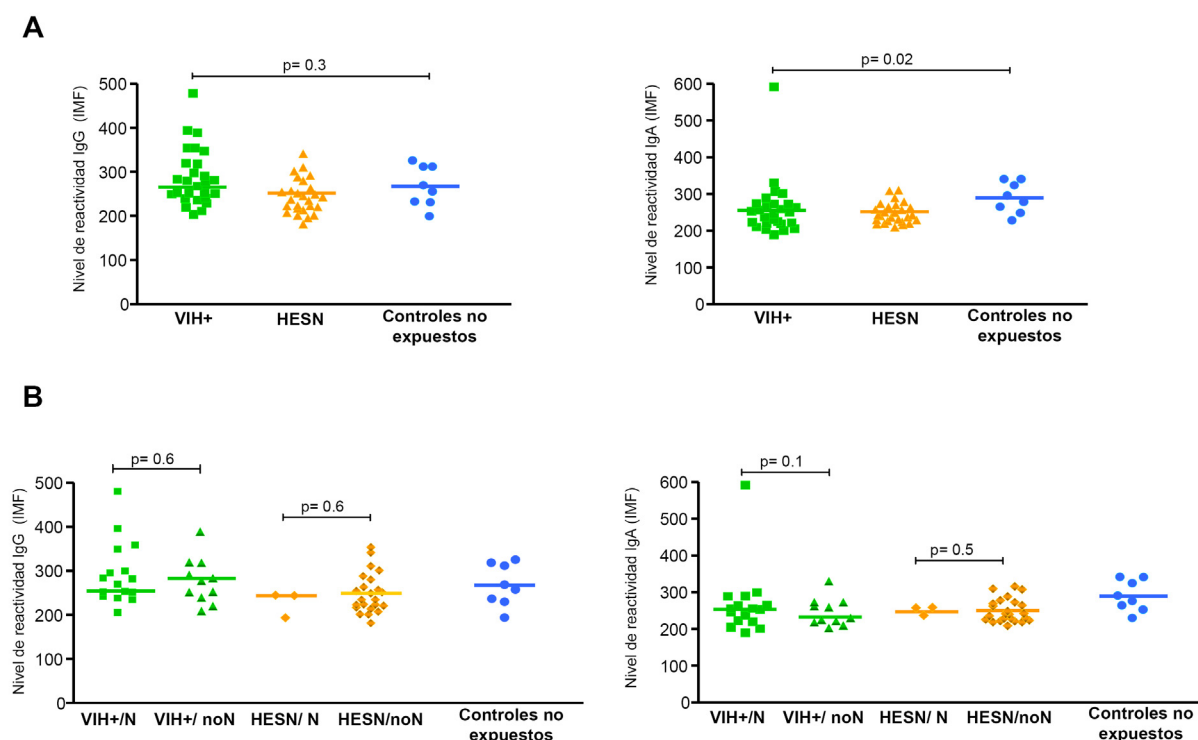


Figura 24. A) Niveles de reactividad IgG e IgA frente a receptores celulares (CD4, CCR5 y CXCR4) en los individuos VIH+, HESN y controles no expuestos. **B)** Niveles de reactividad IgG e IgA frente a receptores celulares en los individuos VIH+ y HESN con (N) o sin (noN) actividad neutralizante. IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

5.6. Distribución de los alelos HLA clase I y clase II y de genes KIR

Para la determinación de la distribución de los alelos clase I y II y de los genes KIR, se analizaron 29 individuos HESN, 61 sujetos VIH+ (de los cuales 29 eran las parejas de los individuos HESN) y 62 controles no expuestos.

5.6.1. Prevalencia de supertipos y alelos de HLA clase I y clase II

Inicialmente, los alelos HLA clase I y clase II se agruparon en supertipos. Dichos supertipos representan grupos de moléculas HLA que comparten especificidad de unión a péptidos. En la **Tabla 10** se muestra la prevalencia de los supertipos y alelos HLA presentes en los tres grupos de individuos estudiados (HESN, VIH+, controles no expuestos). Se observó que el supertipo HLA-B44 fue significativamente más prevalente en los individuos HESN (83%), comparado con los pacientes VIH+ (66%) y con los controles no expuestos (44%) ($p=0.001$). Una tendencia similar fue observada para el supertipo HLA-A3, el cual fue más frecuente en los individuos HESN (62%) comparado con los pacientes VIH+ (42%) y con los controles no expuestos (35%) ($p=0.06$). Además, el 97% de los HESN expresaron al menos uno de estos dos supertipos, comparado con el 78% de los pacientes VIH+ y el 64% de los controles no expuestos ($p=0.003$). En contraste, la prevalencia del supertipo HLA-B62 fue más baja en los individuos HESN (3%) que en los pacientes VIH+ (13%) y los controles sanos (24%) ($p=0.03$). Con respecto a la prevalencia de supertipos de HLA clase II, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de individuos estudiados (**Tabla 10**).

En cuando a la prevalencia de alelos individuales HLA clase I y clase II, se observó que la frecuencia del alelo HLA-A*33:01 fue significativamente mayor en los individuos HESN (14%) comparados con los pacientes VIH+ y los controles no expuestos (3% para ambos), ($p=0.04$). Por el contrario, la frecuencia del alelo HLA-A*02:01 fue más baja en los individuos HESN (27%) comparados con los pacientes VIH+ (52%) y con los controles no expuestos (47%), ($p=0.08$).

Los alelos HLA-B*15:01 y HLA-C*03:03 (los cuales están en desequilibrio de unión), estuvieron ausentes en los individuos HESN mientras que la frecuencia de este grupo de alelos fue del 10% en los pacientes VIH+ y del 18% en los controles no expuestos ($p=0.03$). (**Tabla 10**).

Tabla 10. Prevalencia de supertipos y alelos HLA clase I y clase II en los individuos HESN, individuos VIH+ e individuos no expuestos

	% (Nº) de individuos			valor p ^a		
	HESN (n = 29)	VIH+ (n = 61)	Controles (n = 62)	gobal	HESN vs VIH+	HESN vs Controles
HLA Clase I						
Supertipos						
S-A1	59 (17)	59 (36)	52 (32)	0.6	0.9	0.5
S-A2	41 (12)	59 (36)	53 (33)	0.3	0.1	0.3
S-A3	62 (18)	42 (26)	35 (22)	0.06	0.08	0.02
S-A24	17 (5)	13 (8)	34 (21)	0.02	0.6	0.1
S-B7	55 (16)	52 (32)	56 (35)	0.9	0.8	0.9
S-B8	7 (2)	11 (7)	11 (7)	0.7	0.7	0.5
S-B27	35 (10)	28 (17)	34 (21)	0.72	0.5	0.9
S-B44	83 (24)	66 (40)	44 (27)	0.001	0.09	<0.0001
S-B58	7 (2)	11 (7)	5 (3)	0.4	0.7	0.7
S-B62	3 (1)	13 (8)	24 (15)	0.03	0.2	0.1
Alelos*						
A*33:01	14 (4)	3 (2)	3 (2)	0.04	0.08	0.08
A*02:01	27 (8)	52 (32)	47 (29)	0.08	0.02	0.08
B*15:01/C*03:03	0	10 (6)	18 (11)	0.03	0.08	0.01
HLA Clase II						
Supertipos						
S-DR1	62 (18)	66 (40)	73 (45)	0.5	0.3	0.7
S-DR3	28 (8)	23 (14)	19 (12)	0.7	0.4	0.6
S-DR4	31 (9)	23 (14)	21 (13)	0.6	0.3	0.4
S-DR5	52 (15)	53 (32)	57 (35)	0.9	0.7	0.9
S-DR9	2 (1)	0 (0)	2 (1)	0.7	0.5	0.5
S-DQ1	48 (14)	61 (37)	53 (33)	0.5	0.7	0.3
S-DQ2	45 (13)	44 (27)	52 (32)	0.7	0.5	0.9
S-DQ3	66 (19)	66 (40)	52 (32)	0.2	0.2	1.0
Alelos*						
DRB1*04	34 (10)	15 (9)	18 (11)	0.03	0.03	0.07
DQB1*03:02	31 (9)	11 (7)	10 (6)	0.01	0.02	0.02

* Se han incluido únicamente los alelos cuya frecuencia presentó diferencias significativas entre los grupos de estudio.

^a Todas las comparaciones se han realizado con una prueba de Chi-cuadrado.

En cuando a la frecuencia de alelos HLA clase II, se observó una frecuencia incrementada de los alelos HLA-DRB1*04 y DQB1*03:02 en los individuos HESN (34% y 31%, respectivamente) comparados con los pacientes VIH+ (15% y 11%, respectivamente) y los controles no expuestos (18% y 10%, respectivamente), ($p=0.03$ y $p=0.01$, respectivamente) (**Tabla 10**)

5.6.2. Asociación de los supertipos y alelos de HLA clase I y clase II con el estatus HESN

Para determinar si los supertipos y alelos HLA clase I y II estaban significativa e independientemente asociados con el estatus HESN, se realizó un análisis de regresión logística univariante y multivariante empleando como variable dependiente del modelo el estatus HESN y como variables independientes todos los alelos y supertipos HLA que mostraron diferencias significativas al comparar los individuos HESN con el resto de grupos.

El análisis univariante mostró que los supertipos HLA-A3 y B44, al igual que los alelos A*33:01 DRB1*04 y DQB1*03:02 mostraron una tendencia o una asociación significativa con un incremento en la probabilidad de ser un individuo HESN. Por el contrario, la presencia del alelo A*02:01 estuvo significativamente asociada con una probabilidad disminuida de ser un individuo HESN (**Tabla 11**). La odds ratio para el grupo de alelos B*15:01 y C*03:03 no pudo ser calculada ya que su frecuencia en los individuos HESN fue nula.

En el análisis multivariante se incluyeron las variables que mostraron una tendencia o una asociación significativa con el estatus HESN en el análisis univariante. Se

observó que el alelo DQB1*03:02 (OR 3.4; IC 95% 1.1-10.5; $p=0.02$) fue el único predictor independiente del estatus HESN y el alelo A*02:01 (OR 0.4; IC 95% 0.1-0.9; $p=0.03$) fue un predictor independiente de una disminuida probabilidad de tener el estatus HESN (**Tabla 11**).

Tabla 11. Asociación entre los supertipos y alelos HLA clase I y clase II con el estatus HESN

Superipos y alelos HLA	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	OR	95% IC	valor p	OR	95% IC	valor p
S-A3	2.2	0.9 - 5.4	0.08	1.6	0.6 - 4.5	0.3
S-B44	2.5	0.8 - 7.5	0.09	2.6	0.7 - 9.2	0.1
S-B62	0.2	0 - 1.9	0.2	0.2	0.02 - 2.1	0.2
A*02:01	0.3	0.13 - 0.9	0.03	0.4	0.1 - 0.9	0.03
A*33:01	4.7	0.8 - 27	0.08	4.2	0.6 - 29	0.1
DRB1*04	3.0	1.0 - 8.6	0.04	1.4	0.2 - 9.5	0.7
DQB1*03:02	3.4	1.1 - 10.6	0.03	3.4	1.1 - 10.5	0.03

S: supertipo; **IC:** intervalo de confianza; **OR:** odds ratio.

5.6.3. Frecuencia de genes KIR

La distribución de genes KIR se analizó tanto de manera individual como agrupados en los haplotipos AA (contiene únicamente genes KIR inhibidores) y Bx (contiene principalmente genes activadores aunque puede haber presencia de genes inhibidores). No se observaron diferencias significativas al comparar la distribución de genes y haplotipos KIR entre los diferentes grupos de estudio (HESN, VIH+ y controles no expuestos). Cuando evaluamos la presencia de genes KIR en asociación con sus ligandos específicos HLA clase I, encontramos que la frecuencia del gen inhibidor KIR3DL1 junto con los ligandos pertenecientes al grupo HLA-Bw4, así como la frecuencia de los genes inhibidores KIR2DL2 y KIR3DL3 junto con sus

ligandos pertenecientes al grupo HLA-C fueron similares para todos los grupos estudiados. De igual forma, la distribución de los genotipos KIR tampoco difirió entre los grupos (**Tabla 12**).

Tabla 12. Frecuencia de genes, haplotipos y genotipos KIR y sus ligandos HLA en los individuos HESN, VIH+ y controles no expuestos.

Gen KIR	% (nº) de individuos			valor p		
	HESN (n = 29)	VIH+ (n = 61)	Controles (n = 62)	gobal	HESN vs Controles	HESN vs VIH+
KIR2DL1	90 (27)	93 (27)	100 (62)	0.5	0.09	0.2
KIR2DL2	45 (13)	57 (35)	50 (31)	0.5	6	0.3
KIR2DL3	83 (24)	87 (24)	92 (57)	0.4	3	0.7
KIR2DL4	100 (29)	100 (61)	100 (62)			
KIR2DL5	52 (15)	64 (39)	50 (31)	0.26	1	0.3
KIR3DL1	97 (28)	93 (55)	90 (56)	0.5	0.4	0.3
KIR3DL2	97 (28)	100 (61)	98 (61)	0.4	0.5	0.3
KIR3DL3	100 (29)	100 (61)	100 (62)			
KIR2DS1	38 (11)	52 (32)	37 (23)	0.2	1	0.2
KIR2DS2	45 (13)	57 (35)	50 (31)	0.5	0.6	0.3
KIR2DS3	21 (6)	36 (22)	29 (18)	0.3	0.4	0.1
KIR2DS4	31 (9)	31 (19)	37 (23)	0.7	0.6	0.9
KIR2DS4N	76 (22)	72 (44)	81 (50)	0.5	0.6	0.7
KIR2DS5	41 (12)	43 (26)	31 (19)	0.3	0.3	0.9
KIR3DS1	38 (11)	51 (31)	42 (26)	0.4	0.7	0.2
KIR2DP1	93 (27)	97 (59)	100 (62)	0.1	0.09	0.4
KIR3DP1	100 (29)	100 (61)	100 (62)			
Haplotipos KIR						
AA	29 (8)	20 (12)	36 (22)	0.2	0.5	0.3
Bx	71 (20)	80 (49)	64 (40)	0.1	0.5	0.3
Genotipos KIR						
KIR3DL1/3DL1	62 (18)	49 (30)	58 (36)	0.4	0.7	0.2
KIR3DL1/3DS1	34 (10)	41 (25)	32 (20)	0.6	0.8	0.5
KIR3DS1/3DS1	3 (1)	10 (6)	10 (6)	0.4	0.4	0.3
KIR2DL2/2DL3	28 (8)	44 (27)	42 (26)	0.2	0.2	0.1
KIR2DL2/2DL2	17 (5)	13 (8)	8 (5)	0.4	0.3	0.7
KIR2DL3/2DL3	55 (16)	42 (26)	50 (31)	0.5	0.6	0.3
Combinaciones KIR/HLA						
KIR3DL1 ⁺ Bw4 ⁺	61 (17)	69 (38)	73 (41)	0.5	0.3	0.4
KIR3DL1 ⁺ 3DL1 ⁺ Bw4 ⁻	17 (5)	12 (7)	16 (10)	0.7	1.0	0.5
KIR2DL2 ⁺ C1 ⁺	38 (11)	44 (27)	45 (28)	0.8	0.5	0.6
KIR2DL3 ⁺ C1 ⁺	62 (18)	72 (44)	79 (49)	0.2	0.08	0.3

5.7. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs12979860 cercano al gen de la *IL28B*

Para estudiar el posible papel del polimorfismo rs12979860 en la protección frente a la infección por el VIH, analizamos la prevalencia de los tres posibles genotipos (homocigoto salvaje TT, heterocigoto TC y homocigoto mutado CC) en los tres grupos de individuos incluidos en el estudio, bajo la hipótesis de que un efecto beneficioso de alguno de estos genotipos en la susceptibilidad a la infección, incrementaría significativamente su prevalencia en la población de sujetos HESN al compararlos con la población de pacientes VIH+. Encontramos que la prevalencia del genotipo rs12979860-CC fue mayor en los individuos HESN (62%) comparado con los pacientes VIH+ (45%), aunque no hubo diferencias significativas cuando se compararon ambos grupos ($p=0.2$). Para los genotipos CT y TT las prevalencias fueron de 35% y 3% para los individuos HESN y del 38% y 17% para los pacientes VIH+ (**Figura 25**).

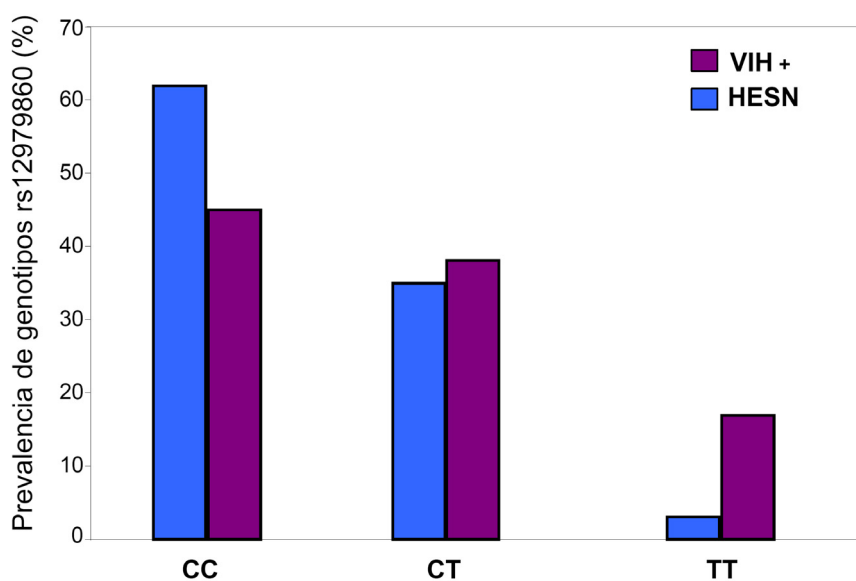


Figura 25. Prevalencia de los genotipos del polimorfismo rs12979860 de la región cercana al gen de la *IL28B* en los individuos HESN y sus parejas VIH+

6. Discusión

6.1. Respuesta específica frente al VIH mediada por células T CD4+ y CD8+

Varios estudios han demostrado de manera consistente el importante papel que tienen las células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH en el mantenimiento de una adecuada respuesta inmunológica frente al virus, la cual contribuye en gran medida al control de la infección (Norris *et al.*, 2004; Borrow *et al.*, 1994). De acuerdo con estos estudios, tiene sentido pensar que la respuesta inmunológica mediada por células T CD4+ y CD8+ también puede tener un papel crucial en el establecimiento de una respuesta protectora frente a la infección por el VIH en individuos HESN.

Un hallazgo notable de este trabajo de tesis doctoral fue el hecho de encontrar una alta prevalencia de respuesta de células T CD4+ y CD8+ VIH específicas en los individuos HESN, los cuales mantenían una relación de pareja estable con pacientes VIH+. Cerca de las dos terceras partes de los sujetos VIH+ estaban bajo tratamiento antirretroviral y por consiguiente tenían carga viral indetectable. Esta característica hace que la cohorte de individuos HESN estudiados difiera sustancialmente de otras cohortes donde los miembros VIH+ tienen altos niveles de carga viral plasmática (Promadej *et al.*, 2003; Suy *et al.*, 2007; Skurnick *et al.*, 2002; Bienzle *et al.*, 2000). En este sentido, nuestro estudio es el primero en examinar la presencia de este tipo de respuesta en un grupo de individuos HESN con baja exposición al virus. Además, los HESN cuyas parejas VIH+ tenían una carga viral plasmática indetectable, exhibieron una mayor frecuencia de respuesta VIH específica mediada por células T CD4+ y CD8+ que aquellos HESN cuyas parejas tenían niveles detectables de carga viral. Estos resultados sugieren que una exposición persistente a inóculos bajos del VIH puede ser suficiente para inducir una respuesta específica frente al virus.

La medición simultánea de dos citoquinas y el empleo de péptidos solapantes que abarcan todo el genoma del virus, pueden explicar la mayor prevalencia de respuesta observada en este estudio en comparación con estudios previos, en los cuales la prevalencia de respuesta ha sido menor empleando solo algunas proteínas virales ([Kebba et al., 2004](#); [Promadej et al., 2003](#); [Suy et al., 2007](#)) o péptidos restringidos a ciertos alelos HLA clase I ([Hladik et al., 2003](#); [Makedonas et al., 2005](#); [Makedonas et al., 2002](#)). Otros estudios en los cuales solo han medido una citoquina, también han encontrado menor prevalencia de respuesta en estos sujetos ([Jennes et al., 2004](#); [Kebba et al., 2004](#)). Las citoquinas analizadas en el presente estudio (IFN γ y MIP1 β) han sido previamente reconocidas como las más sensibles para detectar respuesta de las células T específicas del VIH en pacientes infectados ([Betts et al., 2006](#)).

La metodología empleada para medir la respuesta de las células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH, permitió analizar no solo el nivel de respuesta sino además la amplitud y el perfil funcional de la respuesta de estas células. La amplitud de la respuesta mediada por las células T CD4+ y CD8+ VIH específicas, fue similar en los individuos HESN y en sus respectivas parejas VIH+. Sin embargo, hubo diferencias en las proteínas virales frente a las cuales respondieron ambos grupos de sujetos. Los individuos HESN presentaron una mayor respuesta mediada por las células T CD4+ frente a las proteínas Pol y Env, mientras que las células T CD8+ de estos individuos respondieron principalmente frente a Nef. En contraste, la respuesta mediada por las células T CD4+ de las parejas VIH+ fue dirigida frente a Gag y Nef y las células T CD8+ respondieron principalmente frente a Gag y Pol. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios previos en los cuales han observado que los

individuos HESN y los sujetos VIH+ responden a diferentes proteínas del VIH ([Kaul et al., 2001a](#); [Kebba et al., 2004](#)).

El diseño transversal de este estudio no permite asegurar que la existencia de respuesta de las células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH en los individuos HESN tenga un papel protector frente a la infección. Sin embargo, los resultados encontrados tienen una implicación clínica importante, ya que la alta prevalencia de respuesta de células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH en los individuos HESN cuyas parejas tienen carga viral VIH indetectable, sugiere que existe una exposición real al virus y que incluso bajos inóculos virales son capaces de inducir respuesta de las células T en los sujetos HESN.

Asumiendo que la presencia de respuesta de células T CD4+ y CD8+ VIH específicas encontrada en los individuos HESN, sea una consecuencia directa de la exposición al virus, resultaría interesante saber por cuánto tiempo puede persistir esta respuesta después de que cese la exposición. En el presente estudio un individuo HESN presentó respuesta detectable de células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH a pesar de tener una exposición “nula” al virus ya que manifestó el uso constante de preservativo en sus contactos sexuales. Sin embargo, su pareja VIH+ estuvo embarazada (por concepción natural) dos años previos al estudio. Con lo cual, la respuesta de células T CD4+ y CD8+ específicas del VIH encontrada en este sujeto HESN fue probablemente inducida tiempo atrás y persistió por al menos dos años en ausencia de prácticas de riesgo con su pareja VIH+. Este hallazgo es consistente con dos estudios previos en los que se demuestra la presencia de una respuesta mediada por células T específicas del VIH, persistente en el tiempo en

individuos HESN que interrumpen las prácticas de riesgo de exposición al virus ([Bernard et al., 1999](#); [Promadej et al., 2003](#)). Estos resultados sugieren que una continua exposición al VIH no es indispensable para mantener, al menos por un período de tiempo, una respuesta específica mediada por las células T en individuos HESN.

Debido a que la probabilidad de transmisión sexual del VIH depende de la carga viral plasmática del individuo portador del virus ([Quinn et al., 2000](#)), se asume que los individuos VIH+ que están bajo TARGA y presentan niveles de carga viral plasmática indetectables, tienen una probabilidad muy baja de transmitir el virus a través del contacto sexual ([Barreiro et al., 2007](#); [Vernazza P et al., 2008](#)). Sin embargo, la indetectabilidad del virus a nivel plasmático, no descarta que en el semen o en las secreciones vaginales la viremia sea detectable. De hecho, la viremia en el semen puede oscilar a pesar de que se mantenga indetectable en plasma ([Lambert-Niclot et al., 2012](#)). Los resultados de este trabajo de tesis doctoral tienen una implicación epidemiológica importante, ya que se muestra que la exposición al VIH puede ocurrir incluso en individuos HESN cuyas parejas VIH+ mantienen niveles indetectables de virus en el plasma de forma persistente. En esta situación, la exposición a tan bajos niveles de virus a través secreciones genitales puede no ser significativa para una transmisión efectiva del virus, pero si para inducir una respuesta inmunológica celular. Un mecanismo que podría explicar esto es la exposición a partículas virales defectuosas o simplemente a proteínas virales ([Sheth P et al., 2009](#)).

En resumen, los resultados de este estudio relativos a la respuesta inmunológica frente al VIH mediada por células T CD4+ y CD8+, demuestran que la exposición

sexual al virus se produce incluso en condiciones de máxima supresión virológica en el paciente infectado y que esta exposición es suficiente para estimular la aparición de respuesta celular específica. Por otra parte, el diseño transversal de este estudio, no permite concluir si la existencia de este tipo de respuesta está asociada con una resistencia a la infección. Para resolver esto, son necesarios estudios longitudinales en los que se evalúe la incidencia de seroconversión en función de la existencia o no de dicha respuesta.

6.2. Respuesta mediada por células T DN ($CD3^+CD4^-CD8^-$)

Con el objetivo de desvelar potenciales correlatos de protección inmunológica en los individuos HESN más allá de la respuesta específica del VIH mediada por las células T $CD4^+$ y $CD8^+$, se analizó el nivel de reactividad específica frente al VIH por parte de las células T DN y de las subpoblaciones de células T $DN/\gamma\delta^+$ y $DN/\alpha\beta^+$. En general, se encontraron proporciones similares de células T DN totales en los tres grupos de individuos estudiados (HESN, VIH+ y controles no expuestos). Además, la mayoría de las células T DN expresaron un TCR $\gamma\delta$ y la proporción de éstas células no difirió significativamente entre los grupos de estudio.

La proporción de células T $DN/\alpha\beta^+$ tampoco difirió significativamente entre los individuos HESN y los sujetos no expuestos. Sin embargo, se encontró un incremento significativo en la proporción de células T $DN/\alpha\beta^+$ en los individuos VIH+ comparado con los individuos HESN y los sujetos no expuestos. El incremento de éstas células en los individuos VIH+ podría ser consecuencia de que en la infección por el VIH, las células T $DN/\alpha\beta^+$ pueden derivar de células T $CD4^+$ que han sufrido

una regulación a la baja de la molécula CD4 y este proceso estaría mediado por proteínas virales (Emerman y Malim, 1998). De hecho, algunos autores han sugerido que estas células podrían representar una importante fuente de virus infecciosos y de persistencia viral (Cheney *et al.*, 2006; Marodon *et al.*, 1999). Por otra parte, un estudio reciente realizado en sooty mangabeys (*Cercocebus atys*) infectados con el virus de la inmunodeficiencia en simios, sugiere que las células T DN/ $\alpha\beta^+$ podrían parcialmente compensar el deterioro de la funcionalidad de las células T CD4⁺ en estos animales, los cuales permanecen asintomáticos a pesar de tener una importante disminución de sus células T CD4⁺ (Milush *et al.*, 2011). La probabilidad de que estas células T DN/ $\alpha\beta^+$ puedan también tener un papel beneficioso en la infección por el VIH en humanos, se desconoce hasta la fecha.

Con respecto a la funcionalidad de las células T DN, se evaluó la capacidad de estas células para producir citoquinas en respuesta a un estímulo policlonal. Curiosamente, se observó que las células T DN/ $\gamma\delta^+$ de los individuos VIH⁺ desplegaron una mayor producción de MIP1 β^+ e IFN γ^+ comparados con los sujetos HESN y los individuos no expuestos. Estos resultados contrastan con estudios previos en los que se muestra una reducida producción de IFN γ^+ por las células T $\gamma\delta$ en pacientes VIH⁺ (Kosub *et al.*, 2008). Sin embargo, en dicho estudio evaluaron la respuesta mediada por el total de las células T $\gamma\delta$ y no por la subpoblación DN/ $\gamma\delta^+$, lo cual puede explicar la discordancia entre los resultados. Posiblemente la respuesta incrementada de las células T DN/ $\gamma\delta^+$ frente a un estímulo policlonal encontrada en los pacientes VIH⁺, pueda deberse a que esta subpoblación de células T está hiperactivadas como consecuencia de la continua estimulación por el virus. Curiosamente las células T DN/ $\gamma\delta^+$ de los individuos HESN mostraron una mayor

capacidad de producción de $\text{MIP1}\beta^+$ e $\text{IFN}\gamma^+$ comparados con los sujetos no expuestos, sugiriendo que la exposición al virus en estos individuos HESN podría dar como resultado la activación de esta subpoblación celular.

Estudios previos en pacientes infectados con el VIH+, han evaluado la respuesta de las células $\text{T}\gamma\delta$ tras el estímulo con fosfoantígenos como el IPP (isopropenil phirophosphate) (Kosub *et al.*, 2008; Riedel *et al.*, 2009), ya que se considera que esto reproduce la respuesta fisiológica de las células $\text{T}\gamma\delta$ frente a una gran variedad de patógenos (Chen y Letvin, 2003). Sin embargo, se ha encontrado que algunos antígenos peptídicos también pueden ser reconocidos por las células $\text{T}\gamma\delta$ en humanos (Barcy *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Li y Wu, 2008). Los resultados de esta tesis muestran que las células $\text{T DN}/\gamma\delta^+$ desplegaron una respuesta específica frente a la proteína Gag del VIH, siendo observada dicha reactividad en el 30% de los individuos VIH+ y en el 7% de los sujetos HESN. La respuesta de estas células en los pacientes VIH+, está en línea con otros estudios donde han encontrado actividad lítica y proliferativa frente al VIH mediada por las células $\text{T}\gamma\delta$ (Wallace *et al.*, 1996). Por otra parte, ningún estudio hasta la fecha había mostrado la existencia de respuesta frente al VIH mediada por esta población celular en sujetos HESN. Los resultados de esta tesis muestran que dicha respuesta puede aparecer en individuos expuestos al VIH pero que no se infectan.

Con respecto a las células $\text{T DN}/\alpha\beta^+$, varios autores han sugerido que esta población celular puede tener un papel en la prevención de las infecciones virales mediante la producción de citoquinas activadoras de macrófagos así como de citoquinas con actividad antiviral (Thomson *et al.*, 2006). En el presente estudio se encontró

respuesta específica frente al VIH medida por las células T DN/ $\alpha\beta^+$ en aproximadamente la cuarta parte de los individuos HESN. De nuevo, este estudio es el primero en mostrar la existencia de respuesta específica frente al VIH mediada por esta población celular en sujetos HESN. Aunque el diseño transversal del estudio no permite extraer conclusiones a cerca del posible papel de esta respuesta en la resistencia a la infección por el VIH, hay que destacar que en el modelo animal de infección por virus de la inmunodeficiencia en simios, se ha observado que la presencia de respuesta de las células T DN/ $\alpha\beta^+$ específicas puede proteger frente a la progresión de la infección ([Milush et al., 2011](#)).

Para dos de los tres HESN que presentaron respuesta detectable de las células T DN/ $\alpha\beta^+$ VIH-específicas, se disponía de información sobre la respuesta mediada por las células T CD4+ y CD8+ frente a las proteínas del VIH. Interesantemente, uno de estos dos individuos HESN con respuesta de células T DN/ $\alpha\beta^+$ VIH-específica, mostró también respuesta específica frente al VIH mediada por las células T CD4+ y CD8+. Esto sugiere que la exposición sexual al VIH en los individuos HESN puede inducir una respuesta inmunológica celular específica frente al virus, mediada por una amplia gama de poblaciones de células T. La protección frente a la transmisión sexual del VIH parece ser el resultado de varios factores inmunológicos y los resultados de este estudio muestran que no solo las células T CD4+ y/o CD8+ sino también las células T DN pueden estar jugando un papel importante en este fenómeno. Sin embargo, son necesarios estudios longitudinales para dilucidar si la respuesta mediada por las células T DN VIH-específicas puede contribuir a la protección frente a la infección por el VIH o si solo refleja la exposición al virus.

6.3. Estado de maduración y activación de las células T CD4+ y CD8+

En el presente estudio se observaron niveles incrementados de activación de las células T en los individuos HESN, un hallazgo que se asemeja a lo que ocurre en los pacientes infectados por el VIH, los cuales presentan un aumento en los niveles de activación de diversas poblaciones linfocitarias (Eggena *et al.*, 2005; Hunt *et al.*, 2008).

Estudios previos en este tema han mostrado resultados discordantes. En algunos de ellos se han encontrado alteraciones en la distribución de subpoblaciones de células T e incluso en los niveles de activación en sujetos HESN (Biasin *et al.*, 2000; Suy *et al.*, 2007), mientras que en otros se ha observado una disminución del nivel de activación de las células T en sujetos HESN comparados con controles no expuestos (Begaud *et al.*, 2006; Koning *et al.*, 2005). La interpretación que los autores hacen de estos estudios es distinta. El aumento en la activación celular en sujetos HESN lo interpretan como una consecuencia de la exposición al virus pero no necesariamente como un marcador de protección (Biasin *et al.*, 2000; Suy *et al.*, 2007). Por otro lado, la disminución en la activación de células T en los sujetos HESN, observada en otros estudios, es interpretada como un factor intrínseco del individuo, independiente de la exposición al VIH y que le confiere resistencia a la infección (Begaud *et al.*, 2006; Koning *et al.*, 2005).

Un hallazgo interesante de esta tesis fue el hecho de que los individuos HESN que mostraron respuesta inmunológica detectable frente al VIH mediada por las células T CD4+ y/o CD8+, presentaron también bajos niveles de células T CD8+ naïve y un número incrementado de células T CD8+ efectoras además de altos niveles de

activación de estas subpoblaciones celulares en comparación con los individuos HESN que no presentaron respuesta detectable de las células T CD4+ y/o CD8+. Esta asociación entre la existencia de respuesta virus específica y activación inmune está claramente a favor de que en esta cohorte de individuos HESN hay una exposición real al VIH. Sería de gran interés analizar, en un estudio longitudinal, si los sujetos HESN que presentan simultáneamente respuesta celular específica y un incremento en la activación de las células T CD8+, tienen una tasa de seroconversión disminuida.

6.4. Características de la respuesta humoral específica frente al VIH

Al igual que la respuesta inmunológica celular, la respuesta humoral frente al VIH ha sido previamente estudiada en individuos HESN, con el fin de definir parámetros inmunológicos de protección contra la infección ([Devito et al., 2000b](#); [Hasselrot et al., 2009a](#); [Lo Caputo et al., 2003](#); [Nguyen et al., 2006](#)). Sin embargo, la evaluación de la respuesta humoral conjuntamente con la respuesta celular y su potencial asociación en los sujetos HESN ha sido escasamente explorada ([Hirbod et al., 2008](#); [Nguyen et al., 2006](#)). En esta tesis doctoral se ha evaluado la actividad neutralizante y la reactividad frente a la envuelta del VIH y su asociación con la presencia de respuesta de células T CD4+ y CD8+ VIH-específicas en 27 individuos HESN.

La neutralización del VIH es un mecanismo de protección efectivo contra la infección que se ha observado en algunos individuos HESN ([Mazzoli et al., 1999](#); [Devito et al., 2000b](#)). En este estudio se observó actividad neutralizante frente a varios aislados del VIH en el plasma del 11% (3/27) de los sujetos HESN. Tanto la IgG como la IgA VIH-específicas han sido involucradas en la actividad neutralizante que presentan

algunos individuos HESN expuestos sexualmente al VIH ([Mazzoli et al., 1999](#); [Devito et al., 2000b](#)). Sin embargo, en el presente estudio no fue posible determinar qué fracción de inmunoglobulinas presentes en el plasma de estos individuos, podría estar mediando la actividad neutralizante observada. Sería interesante, en un estudio futuro, determinar cuál es el componente plasmático asociado a la actividad neutralizante presente en estos individuos HESN.

La capacidad para generar anticuerpos contra el VIH tanto a nivel sistémico como en mucosas, ha sido descrita en individuos HESN, a pesar de que éstos muestran resultados negativos en el ELISAs y western blot empleados para el diagnóstico del VIH ([Hasselrot et al., 2009a](#); [Lo Caputo et al., 2003](#); [Lopalco et al., 2000b](#); [Nguyen et al., 2006](#)). Los resultados de esta tesis muestran la presencia de anticuerpos IgG o IgA reactivos frente a las proteínas de la envuelta del VIH en la mayoría de los individuos HESN, a pesar de que éstos tenían western blots negativos. En este ensayo se evaluaron proteínas de la envuelta viral expresadas en la membrana celular, al contrario de proteínas desnaturalizadas que se emplean para las pruebas de western-blot para diagnóstico. Esto puede explicar los resultados discordantes entre ambos ensayos. También se observó en estos sujetos, un incremento en el reconocimiento de proteínas de la envuelta viral después de la exposición de epítopos inducidos por la unión con la molécula CD4, los cuales incluyen epítopos involucrados en el proceso de fusión ([Koshiba y Chan, 2003](#); [Sullivan et al., 1998](#)). Esto sugiere la presencia de respuesta humoral específica frente a un amplio repertorio de epítopos de la envuelta del VIH en sujetos HESN.

En este estudio se detectó reactividad frente a la envuelta viral en la mayoría de los HESN. Sin embargo, al ser un estudio transversal, no se pudo determinar una

relación causal entre la presencia de esta respuesta y la protección frente a la infección en estos sujetos. Por otra parte, aunque se encontró actividad neutralizante como una evidencia más de una exposición real al VIH en estos sujetos HESN, la baja prevalencia de esta respuesta sugiere que la neutralización podría tener solo un papel residual en la protección. Sin embargo, a pesar de la baja prevalencia de la actividad neutralizante observada en los individuos HESN, no se puede descartar completamente que la respuesta humoral anti-envuelta identificada en la amplia mayoría de estos sujetos, pueda tener un papel activo en la protección frente a la infección. Otros mecanismos como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*) o la activación del complemento, que pueden estimular la secreción de citoquinas por células de sistema inmunológico innato (Tomescu *et al.*, 2011), podrían tener un papel en el fenómeno de baja susceptibilidad a la infección por el VIH en estos individuos.

Factores como la ruta de exposición al virus y la carga viral de la pareja infectada por el VIH, se han asociado con la presencia de respuesta humoral específica en individuos HESN (Hasselrot *et al.*, 2009a). Sin embargo, en el presente estudio, la reactividad específica frente la envuelta viral observada en los individuos HESN fue independiente del nivel de exposición sexual al VIH, determinado por la carga viral (detectable o indetectable) de sus respectivas parejas VIH+, lo cual sugiere que la exposición a inóculos virales de diferentes concentraciones pueden inducir una respuesta humoral específica frente al virus en los sujetos HESN. La presencia de anticuerpos contra la envuelta del VIH en estos sujetos puede representar un factor predictor de exposición al virus, que sumado a la ausencia de signos de infección o de seroconversión, sugiere que estos factores podrían estar relacionados con

mecanismos de protección frente a la infección por el VIH en los individuos HESN. También, podría ser posible que los individuos HESN tengan un enriquecimiento de anticuerpos naturales polireactivos, los cuales se han descrito en la población general ([Casali y Schettino, 1996](#)) o de anticuerpos con reactividad cruzada que sean capaces de reconocer la envuelta del VIH.

La presencia de anticuerpos anti-HLA, anti-CCR5 o anti-CD4 ha sido descrita en diferentes cohortes de sujetos HESN ([Beretta et al., 1996](#); [Lopalco et al., 2000a](#); [Burastero et al., 1996](#)) y esto se ha asociado con el fenómeno de protección frente a la infección. Se realizaron ensayos para evaluar la presencia de anticuerpos con reactividad frente a moléculas CD4, CCR5 y CXCR4. A diferencia de los estudios descritos anteriormente, no se observó la presencia de autoanticuerpos en ninguno de los individuos evaluados, ni siquiera en aquellos que habían presentado actividad neutralizante, con lo cual, la actividad frente al VIH detectada en los sujetos HESN no estaba mediada por la actividad de autoanticuerpos.

Cuando se evaluó si existía una asociación entre la presencia de respuesta humoral frente la envuelta viral y la respuesta mediada por células T CD4+ y CD8+ en los individuos HESN, se observó que aunque más de la mitad de estos sujetos (60%) presentaron los dos tipos de respuesta, la asociación entre ambos tipos de respuesta no alcanzó a ser estadísticamente significativa. Esto sugiere que aunque ambas respuestas estén indicando que existe una exposición real al virus en individuos HESN, dicha exposición puede inducir de manera independiente ambos tipos de respuesta. Resultados similares fueron encontrados por [Nguyen et al.](#), los cuales evaluaron la presencia de respuesta inmunológica humoral y celular anti-VIH

en una cohorte de HESN expuestos sexualmente al virus y encontraron mayor prevalencia de respuesta humoral y no asociación entre ambas respuestas ([Nguyen et al., 2006](#)).

6.5. Distribución de los alelos HLA clase I y clase II y de los receptores KIR

En este estudio se analizó si la aparente protección frente a la infección por el VIH que presentan los individuos HESN, podría estar influenciada por la presencia de determinados alelos HLA o por determinados genes KIR.

La caracterización de los supertipos HLA sirve como una clasificación funcional de varios alelos HLA que se solapan en sus especificidades de antígeno. Se analizó la distribución de los supertipos HLA clase I y clase II en sujetos HESN expuestos sexualmente al virus, comparados con sujetos VIH+ y controles no expuestos. Los supertipos HLA clase I A3 y B44 estaban incrementados en los individuos HESN comparado con los pacientes VIH+ y los controles no expuestos. De hecho, la mayoría de estos sujetos expresaban al menos uno de estos dos supertipos. Esto sugiere que los supertipos B44 y A3 de manera independiente o en combinación, pueden conferir una baja susceptibilidad a la infección por el VIH en los individuos HESN. Por el contrario, se observó una baja frecuencia del supertipo B62 en los individuos HESN, lo cual sugiere que este supertipo podría influir de manera negativa en la susceptibilidad a la infección por el VIH. Este es el primer estudio en individuos HESN, donde se encuentra que los supertipos A3, B44 y B62 podrían influir en la susceptibilidad a la infección por el VIH tras la exposición sexual al virus. En un estudio previo realizado en individuos de raza Afroamericana, se encontró que los supertipos HLA B44 y B62 pueden influir en la tasa de progresión de la infección

en individuos infectados con el VIH. Encontraron que el supertipo B44 estuvo asociado con una rápida progresión de la infección, mientras que el supertipo B62 se asoció con una lenta progresión de la infección ([Lazaryan et al., 2010](#)). Estos resultados son aparentemente contradictorios con los observados en el presente estudio. Sin embargo, es importante destacar, que los individuos VIH+ evaluados en el estudio de Lazaryan *et al.*, eran de etnicidad diferente a la de los individuos HESN evaluados en el presente estudio.

En un segundo análisis, se comparó la prevalencia de alelos individuales HLA clase I y II en individuos HESN y pacientes VIH+. El análisis multivariante mostró que únicamente los alelos HLA DQB1*03:02 y A*02:01 estaban significativamente asociados con el estatus HESN. La presencia del alelo HLA DQB1*03:02 estuvo asociada con una probabilidad incrementada de ser HESN, lo que sugiere una asociación de este alelo con la baja susceptibilidad a la infección. Sin embargo, la presencia del alelo HLA A*02:01 estuvo asociada con una probabilidad disminuida de ser HESN lo que sugiere una asociación de este alelo con una mayor susceptibilidad a la infección. Estudios previos, han evaluado el papel de diferentes alelos del locus HLA-DQB1 o HLA-A en la resistencia a la infección por el VIH ([Hardie et al., 2008b](#); [Liu et al., 2004](#); [Roe et al., 2000](#); [Selvaraj et al., 2006](#); [Shankarkumar et al., 2010](#), [Tang et al., 2008](#)) y en ninguno de ellos se ha observado que los alelos HLA DQB1*03:02 o A*0201 puedan influir en este fenómeno. La discordancia entre los resultados de estos autores y los encontrados en el presente trabajo, probablemente sea debida a la diversidad de etnicidades de los individuos en los que se han evaluado estos alelos.

Finalmente, se analizó la frecuencia de los genes KIR y la co-expresión de sus ligandos HLA clase I específicos en los individuos HESN. En contraste con otros estudios ([Boulet et al., 2008b](#); [Jennes et al., 2006](#)), no se encontró ninguna diferencia en la frecuencia de genes KIR activadores (ej, KIR3DL1) o inhibidores (ej, KIR3DS1), ni tampoco en la frecuencia de co-expresión de un determinado gen KIR con su respectivo ligando HLA cuando se comparó a los sujetos HESN con los pacientes VIH+. Estos resultados discordantes pueden ser debido a la diferencia de etnicidades de las diferentes cohortes de HESN, ya que los individuos HESN incluidos en el presente estudio eran caucasianos, mientras que en el estudio de [Jennes et al.](#), todos los individuos HESN eran de origen Africano ([Jennes et al., 2006](#)). Dado que la frecuencia de genes KIR varía de acuerdo con el grupo étnico ([Middleton y González, 2010](#)), es posible que su potencial efecto en la resistencia a la infección por VIH pueda variar en función de la etnicidad.

6.6. Papel del polimorfismo rs2979860 cercano al gen de la *IL28B* en la baja susceptibilidad a la infección por el VIH en sujetos HESN

La asociación entre el polimorfismo rs2979860 y el aclaramiento de la infección por el VHC es uno de los hallazgos genéticos más importantes de los últimos años ([Thomas et al., 2009b](#); [Rallón et al., 2010](#)). El hecho de que este SNP esté localizado a 3 kb del gen de la *IL28B*/IFN λ 3 ([Ge et al., 2009](#)) y que a su vez el IFN λ 3 esté involucrado en la actividad anti-VIH ([Hou et al., 2009](#)) hace pensar en la posibilidad de que este SNP pudiera estar implicado no solo en la resolución de la infección por el VHC sino también en la protección frente a la infección por el VHC y por el VIH. Sin embargo, en un estudio en individuos expuestos al VHC, pero que

permanecen seronegativos, se observó que la presencia del genotipo protector rs2979860-CC de la *IL28B* no se asociaba con la aparente resistencia que tienen estos individuos frente a la infección por el VHC ([Knapp et al., 2011](#)). Esto refleja que aunque el genotipo protector rs2979860-CC de la *IL28B* tiene un efecto positivo en la respuesta al tratamiento de la hepatitis C y en la resolución espontánea de la infección por el VHC ([Ge et al., 2009a](#); [Rallón et al., 2010c](#); [Thomas et al., 2009b](#)), no necesariamente protege frente a la infección por este virus. Los resultados del presente estudio, tampoco apoyan un papel del genotipo rs2979860-CC de la *IL28B* en la protección frente a la infección por el VIH, ya que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la prevalencia de este genotipo en los sujetos HESN y los individuos VIH+. Sin embargo, es interesante destacar que los sujetos HESN presentaron una prevalencia del genotipo protector rs2979860-CC mayor (62%) que la encontrada en sus parejas VIH+ (45%). Sería interesante estudiar la prevalencia de este genotipo en cohortes más amplias de sujetos HESN, para dilucidar si realmente este genotipo puede estar implicado en el fenómeno de baja susceptibilidad a la infección por el VIH.

7. Conclusiones

1. Una elevada proporción de individuos expuestos seronegativos que mantienen relaciones sexuales estables con individuos VIH+, presentan respuesta celular específica frente al VIH mediada por células T CD4+ y CD8+. Además, presentan respuesta humoral específica frente al VIH mediada por anticuerpos neutralizantes y por anticuerpos frente a la envuelta viral.
2. En una determinada proporción de individuos expuestos seronegativos puede reconocerse además, una respuesta inmunológica celular frente al VIH mediada por células T doble negativas. Este hallazgo sugiere que la exposición sexual al VIH es capaz de inducir una respuesta antiviral mediada por una amplia gama de células T.
3. Los individuos expuestos seronegativos presentan niveles elevados de activación en diferentes subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+, al igual que en los individuos VIH+, lo que apoya la existencia de exposición real al VIH en estos sujetos.
4. Estos resultados sugieren que la exposición al VIH a través de la mucosa genital se produce en los individuos expuestos seronegativos, a pesar de la indetectabilidad del virus en el plasma de sus parejas VIH+. Esta exposición baja, pero persistente, podría ser suficiente para la inducción de respuesta inmunológica específica antiviral.

5. La presencia del alelo HLA-DQB1*03:02 se asoció con una mayor probabilidad de presentar el estatus de expuesto seronegativo, mientras que la presencia del alelo HLA-A*02:01 se asoció con una menor probabilidad de ser expuesto seronegativo. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la distribución de genes y haplotipos KIR al comparar los sujetos expuestos seronegativos y pacientes VIH+.
6. La prevalencia del genotipo protector (CC) del polimorfismo rs12979860 cercano al gen de la *IL28B* estuvo incrementada en los individuos expuestos seronegativos respecto a sus parejas VIH+, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística.
7. En conjunto, estos resultados sugieren que el fenómeno de resistencia a la infección por el VIH en individuos expuestos seronegativos está posiblemente asociado con diversos factores relacionados con la respuesta inmunológica antiviral.

8. *Bibliografía*

- Alimonti JB, Kimani J, Matu L, *et al.* Characterization of CD8 T-cell responses in HIV-1-exposed seronegative commercial sex workers from Nairobi, Kenya. *Immunol Cell Biol.* 2006; 84:482-485.
- Barcy S, De Rosa SC, Vieira J, *et al.* Gamma delta+ T cells involvement in viral immune control of chronic human herpesvirus 8 infection. *J. Immunol.* 2008; 180:3417-3425.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983; 220:868-871.
- Barreiro P, Castilla JA, Labarga P, Soriano V. Is natural conception a valid option for HIV-serodiscordant couples?. *Hum Reprod.* 2007;22: 2353-2358.
- Begaud E, Chartier L, Marechal V, *et al.* Reduced CD4 T cell activation and in vitro susceptibility to HIV-1 infection in exposed uninfected Central Africans. *Retrovirology.* 2006; 3:35.
- Benito JM, López M, Soriano V. The role of CD8+ T-cell response in HIV infection. *AIDS Rev.* 2004; 6:79-88.
- Bernard NF, Yannakis CM, Lee JS, Tsoukas CM. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocyte activity in HIV-exposed seronegative persons. *J Infect Dis.* 1999;179:538-547.
- Betts MR, Nason MC, West SM, *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 2006; 107:4781-4789.
- Biasin M, Caputo SL, Speciale L, *et al.* Mucosal and systemic immune activation is present in human immunodeficiency virus-exposed seronegative women. *J Infect Dis.* 2000; 182:1365-1374.
- Biasin M, Piacentini L, Lo Caputo S, *et al.* Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J Infect Dis.* 2007; 195:960-964.
- Bienzle D, MacDonald KS, Smaill FM, *et al.* Factors contributing to the lack of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission in HIV-1-discordant partners. *J Infect Dis.* 2000; 182:123-132.
- Biron, CA. Interferons alpha and beta as immune regulators: a new look. *Immunity* 2001; 14:661-664.
- Biron,CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17:189-220.
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994; 68:6103-6110.

- Borrow P, Lewicki H, Wei X, *et al.* Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med.* 1997; 3: 205-211.
- Boulet S, Kleyman M, Kim JY, *et al.* A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS.* 2008a; 22:1487-1491.
- Boulet S, Sharafi S, Simic N, *et al.* Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS.* 2008b; 22:595-599.
- Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol.* 2009; 70: 505-515.
- Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1993; 178: 1655-1663.
- Burastero SE, Gaffi D, Lopalco L, *et al.* Autoantibodies to CD4 in HIV type 1-exposed seronegative individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996; 12:273-280.
- Camara M, Dieye TN, Seydi M, *et al.* Low-level CD4+ T cell activation in HIV-exposed seronegative subjects: influence of gender and condom use. *J Infect Dis.* 2010; 201:835-842.
- Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *J Infect Dis.* 2009; 199:1318-1322.
- Casali P, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 210:167-179.
- Chen H, He X, Wang Z, *et al.* Identification of human T cell receptor gammadelta-recognized epitopes/proteins via CDR3delta peptide-based immunobiochemical strategy. *J Biol Chem.* 2008; 283:12528-12537.
- Chen ZW, Letvin NL. Vgamma2Vdelta2+ T cells and anti-microbial immune responses. *Microbes Infect.* 2003; 5:491-498.
- Cheney KM, Kumar R, Purins A, *et al.* HIV type 1 persistence in CD4- /CD8- double negative T cells from patients on antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006; 22:66-75.
- Chiu YL, Greene WC. Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends Immunol.* 2006; 27:291-297.
- Clerici M, Levin JM, Kessler HA, *et al.* HIV-specific T-helper activity in seronegative health care workers exposed to contaminated blood. *JAMA.* 1994; 271:42-46.

- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995; 270:1811-1815.
- Crispin JC, Tsokos GC. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol*. 2009; 183: 4675-4681.
- Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*. 2007; 27:406-416.
- Devito C, Broliden K, Kaul R, *et al*. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol*. 2000a; 165:5170-5176.
- Devito C, Hinkula J, Kaul R. *et al*. Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. *AIDS*. 2000b; 14:1917-1920.
- Devito C, Hinkula J, Kaul R, *et al*. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002; 30:413-420.
- Dorrell L, Hessel AJ, Wang M, *et al*. Absence of specific mucosal antibody responses in HIV-exposed uninfected sex workers from the Gambia. *AIDS*. 2000; 14:1117-1122.
- Eggena MP, Barugahare B, Okello M. *et al*. T cell activation in HIV-seropositive Ugandans: differential associations with viral load, CD4+ T cell depletion, and coinfection. *J Infect Dis*. 2005; 191:694-701.
- Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*. 1998; 280:1880-1884.
- Erickson AL, Willberg CB, McMahan V, *et al*. Potentially exposed but uninfected individuals produce cytotoxic and polyfunctional human immunodeficiency virus type 1-specific CD8(+) T-cell responses which can be defined to the epitope level. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15:1745-1748.
- Eyeson J, King D, Boaz MJ, *et al*. Evidence for Gag p24-specific CD4 T cells with reduced susceptibility to R5 HIV-1 infection in a UK cohort of HIV-exposed-seronegative subjects. *AIDS*. 2003; 17:2299-2311.
- Farquhar C, VanCott TC, Mbori-Ngacha DA, *et al*. Salivary secretory leukocyte protease inhibitor is associated with reduced transmission of human immunodeficiency virus type 1 through breast milk. *J Infect Dis*. 2002; 186: 1173-1176.
- Fischer K, Voelkl S, Heymann J, *et al*. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*. 2005; 105:2828-2835.

- Fowke KR, Kaul R, Rosenthal KL, *et al.* HIV-1-specific cellular immune responses among HIV-1-resistant sex workers. *Immunol Cell Biol.* 2000; 78:586-595.
- Furci L, Lopalco L, Loverro P, *et al.* Non-cytotoxic inhibition of HIV-1 infection by unstimulated CD8+ T lymphocytes from HIV-exposed-uninfected individuals. *AIDS.* 2002; 16:1003-1008.
- Gao X, O'Brien TR, Welzel TM, *et al.* HLA-B alleles associate consistently with HIV heterosexual transmission, viral load, and progression to AIDS, but not susceptibility to infection. *AIDS.* 2010; 24:1835-1840.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, *et al.* Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 2009. 461, 399-401.
- González E, Kulkarni H, Bolivar H, *et al.* The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science.* 2005; 307:1434-1440.
- Gougeon ML, Poccia F, Boullier S. 2000. Human gamma delta T lymphocytes in HIV disease: effector functions and control by natural killer cell receptors. *Springer Semin Immunopathol.* 2000; 22:251-263.
- Goulder PJR, Watkins DI. HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 2004. 4: 630-640.
- Goulder PJR, Watkins DI. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:619-630.
- Harari A, Pantaleo G. HIV-1-specific immune response. *Adv Pharmacol.* 2008; 56:75-92.
- Hardie RA, Knight E, Bruneau B, *et al.* A common human leucocyte antigen-DP genotype is associated with resistance to HIV-1 infection in Kenyan sex workers. *AIDS.* 2008a; 22:2038-2042.
- Hardie RA, Luo M, Bruneau B, *et al.* Human leukocyte antigen-DQ alleles and haplotypes and their associations with resistance and susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS.* 2008b; 22:807-816.
- Hasselrot K, Bratt G, Duvefelt K, Hirbod T, Sandstrom E, Broliden K. HIV-1 exposed uninfected men who have sex with men have increased levels of salivary CC-chemokines associated with sexual behavior. *AIDS.* 2010; 24:1569-1575.
- Hasselrot K, Bratt G, Hirbod T, *et al.* Orally exposed uninfected individuals have systemic anti-HIV responses associating with partners' viral load. *AIDS.* 2009a; 24:35-43.
- Hasselrot K, Saberg P, Hirbod T, *et al.* Oral HIV-exposure elicits mucosal HIV-neutralizing antibodies in uninfected men who have sex with men. *AIDS.* 2009b; 23:329-333.

- Hirbod T, Kaul R, Reichard C, *et al.* HIV-neutralizing immunoglobulin A and HIV-specific proliferation are independently associated with reduced HIV acquisition in Kenyan sex workers. *AIDS*. 2008; 22: 727-735.
- Hladik F, Desbien A, Lang J, *et al.* Most highly exposed seronegative men lack HIV-1-specific, IFN-gamma-secreting T cells. *J Immunol*. 2003, 171:2671-2683.
- Hladik F, Liu H, Speelman E, *et al.* Combined effect of CCR5-Delta32 heterozygosity and the CCR5 promoter polymorphism -2459 A/G on CCR5 expression and resistance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Virol*. 2005; 79:11677-11684.
- Horton RE, Ball TB, Wachichi C, *et al.* Cervical HIV-specific IgA in a population of commercial sex workers correlates with repeated exposure but not resistance to HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009; 25:83-92.
- Hou W, Wang X, Ye L, *et al.* Lambda interferon inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J Virol*. 2009; 83:3834-3842.
- Huang X, Ling H, Mao W, *et al.* Association of HLA-A, B, DRB1 alleles and haplotypes with HIV-1 infection in Chongqing, China. *BMC Infect Dis*. 2009; 9:201.
- Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, *et al.* Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis*. 2008; 197:126-133.
- HyginoJ, Lima PG, Filho RGS, *et al.* Altered immunological reactivity in HIV-1-exposed uninfected neonates. *Clin Immunol*. 2008; 127:340-347.
- Iqbal SM, Ball TB, Levinson P, *et al.* Elevated elafin/trappin-2 in the female genital tract is associated with protection against HIV acquisition. *AIDS*. 2009; 23:1669-1677.
- Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, *et al.* Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:6768-6772.
- Jennes W, Sawadogo S, Koblavi-Deme S, *et al.* Cellular human immunodeficiency virus (HIV)-protective factors: a comparison of HIV-exposed seronegative female sex workers and female blood donors in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Infect Dis*. 2003; 187:206-214.
- Jennes W, Verheyden S, Demanet C, *et al.* Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol*. 2006; 177:6588-6592.
- Jennes W, Vuylsteke B, Borget MY, *et al.* HIV-specific T helper responses and frequency of exposure among HIV-exposed seronegative female sex workers in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Infect Dis*. 2004;189:602-610.
- Kaul R, Dong T, Plummer FA, *et al.* CD8(+) lymphocytes respond to different HIV epitopes in seronegative and infected subjects. *J Clin Invest*. 2001a; 107:1303-1310.

- Kaul R, Plummer FA, Kimani J, *et al.* HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol.* 2000; 164:1602-1611.
- Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, *et al.* Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *J Clin Invest.* 2001b; 107:341-349.
- Kaul R, Rutherford J, Rowland-Jones SL, *et al.* HIV-1 Env-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in exposed, uninfected Kenyan sex workers: a prospective analysis. *AIDS.* 2004; 18:2087-2089.
- Kaur G, Mehra N. Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes. *Tissue Antigens.* 2009; 74:373-385.
- Kebba A, Kaleebu P, Rowland S, *et al.* Distinct patterns of peripheral HIV-1-specific interferon- gamma responses in exposed HIV-1-seronegative individuals. *J Infect Dis.* 2004; 189:1705-1713.
- Knapp S, Warshow U, Ho KMA, *et al.* A polymorphism in IL28B distinguishes exposed, uninfected individuals from spontaneous resolvers of HCV infection. *Gastroenterology.* 2011; 141:320-325.
- Koning FA, Otto SA, Hazenberg MD, *et al.* Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol.* 2005.175, 6117-6122.
- Koshiba T, Chan DC. The prefusogenic intermediate of HIV-1 gp41 contains exposed C-peptide regions. *J Biol Chem.* 2003; 278:7573-7579.
- Kosub DA, Lehrman G, Milush JM, *et al.* Gamma/Delta T-cell functional responses differ after pathogenic human immunodeficiency virus and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections. *J Virol.* 2008; 82:1155-1165.
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, *et al.* IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol.* 2003; 4:69-77.
- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994 ; 68:4650-4655.
- Kuhn L, Schramm DB, Donneringer S, *et al.* African infants' CCL3 gene copies influence perinatal HIV transmission in the absence of maternal nevirapine. *AIDS.* 2007; 21:1753-1761.
- LaCasse RA, Follis KE, Trahey M, Scarborough JD, Littman DR, Nunberg JH. Fusion-competent vaccines: broad neutralization of primary isolates of HIV. *Science.* 1999; 283:357-362.
- Lajoie J, Hargrove J, Zijenah LS, Humphrey JH, Ward BJ, Roger M. Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen

(HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. *J Infect Dis*. 2006; 193:298-301.

Lambert-Niclot S, Tubiana R, Beaudoux C, *et al*. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002-2011 survey. *AIDS*. 2012; 26:971-975.

Lazaryan A, Song W, Lobashevsky E, *et al*. Human leukocyte antigen class I supertypes and HIV-1 control in African Americans. *J Virol*. 2010; 84:2610-2617.

Legrand FA, Nixon DF, Loo CP, *et al*. Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. *PLoS ONE*. 2006; 1:e102.

Lehner T, Wang Y, Pido-Lopez J, Whittall T, Bergmeier LA, Babaahmady K. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. *Vaccine*. 2008; 26:2997-3001.

Levinson P, Kaul R, Kimani J, *et al*. Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition. *AIDS*. 2009; 23:309-317.

Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*. 1993; 57:183-289.

Levy JA, Scott I, Mackewicz C. Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. *Clin Immunol*. 2003; 108:167-174.

Li H, Peng H, Ma P, *et al*. Association between Vgamma2Vdelta2 T cells and disease progression after infection with closely related strains of HIV in China. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:1466-1472.

Li L, Wu CY. CD4+ CD25+ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to *M tuberculosis* antigen ESAT-6. *Blood*. 2008; 111: 5629-5636.

Liu C, Carrington M, *et al*. Lack of associations between HLA class II alleles and resistance to HIV-1 infection among white, non-Hispanic homosexual men. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004; 37:1313-1317.

Liu R, Paxton WA, Choe S, *et al*. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996; 86:367-377.

Lo Caputo S, Trabattoni D, Vichi F, *et al*. Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men. *AIDS*. 2003; 17:531-539.

Lopalco L, Barassi C, Pastori C, *et al*. CCR5-reactive antibodies in seronegative partners of HIV-seropositive individuals down-modulate surface CCR5 in vivo and neutralize the infectivity of R5 strains of HIV-1 In vitro. *J Immunol*. 2000a; 164:3426-3433.

- Lopalco L, Pastori C, Cosma A, *et al.* Anti-cell antibodies in exposed seronegative individuals with HIV type 1-neutralizing activity. *AIDS Res Hum Retroviruse*. 2000b; 16:109-115.
- Louisiriratchanakul S, Liu H, Roongpisuthipong A, *et al.* Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: association of CCR2 64I homozygosity with HIV-1-negative status. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002; 29:314-315.
- MacDonald KS, Embree J, Njenga S, *et al.* Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis*. 1998; 177:551-556.
- MacDonald KS, Embree JE, Nagelkerke NJ, *et al.* The HLA A2/6802 supertype is associated with reduced risk of perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis*. 2001; 183:503-506.
- MacDonald KS, Fowke KR, Kimani J, *et al.* supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus Influence of HLA s type 1 infection. *J Infect Dis*. 2000. 181:1581-1589.
- Mackelprang RD, John-Stewart G, Carrington M, *et al.* Maternal HLA homozygosity and mother-child HLA concordance increase the risk of vertical transmission of HIV-1. *J Infect Dis*. 2008; 197:1156-1161.
- Makedonas G, Bruneau J, Alary M, *et al.* Comparison of HIV-specific CD8 T-cell responses among uninfected individuals exposed to HIV parenterally and mucosally. *AIDS*. 2005; 19:251-259.
- Makedonas G, Bruneau J, Lin H, Sekaly RP, Lamothe F, Bernard NF. HIV-specific CD8 T-cell activity in uninfected injection drug users is associated with maintenance of seronegativity. *AIDS*. 2002; 16:1595-1602.
- Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, *et al.* Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology*. 2006; 131:1887-1898.
- Marodon G, Warren D, Filomio MC, Posnett DN. Productive infection of double-negative T cells with HIV in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:11958-11963.
- Mazzoli S, Lopalco L, Salvi A, *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons. *J Infect Dis*. 1999; 180:871-875.
- McDermott DH, Beecroft MJ, Kleeberger CA, *et al.* Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*. 2000; 14:2671-2678.
- Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. KIR genes. *Transpl Immunol*. 2005; 14:135-142.
- Middleton D y González F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology*. 2010; 129: 8-19.

Migueles S, Connors M. The Role of CD4(+) and CD8(+) T Cells in Controlling HIV Infection. *Curr Infect Dis Rep*. 2002; 4:461-467.

Milush JM, Mir KD, Sundaravaradan V, *et al*. Lack of clinical AIDS in SIV-infected sooty mangabeys with significant CD4+ T cell loss is associated with double-negative T cells. *J Clin Invest*. 2011; 121:1102-1110.

Montoya CJ, Velilla PA, Chougnet C, Landay AL, Rugeles MT. Increased IFN-gamma production by NK and CD3+/CD56+ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. *Clin Immunol*. 2006; 120:138-146.

Nguyen M, Pean P, Lopalco L, *et al*. HIV-specific antibodies but not t-cell responses are associated with protection in seronegative partners of HIV-1-infected individuals in Cambodia. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006; 42:412-419.

Norris PJ, Moffett HF, Yang OO, *et al*. Beyond help: direct effector functions of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4(+) T cells. *J Virol*. 2004; 78:8844-8851.

Pallikkuth S, Wanchu A, Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M. Human immunodeficiency virus (HIV) gag antigen-specific T-helper and granule-dependent CD8 T-cell activities in exposed but uninfected heterosexual partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14:1196-1202.

Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. January 10, 2011; 1-166. Department of Health and Human Services.

Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1993; 328:327-335.

Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, *et al*. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1995; 332:209-216.

Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med*. 2004; 10:806-810.

Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS*. 1999; 13 Suppl A:137-162.

Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, *et al*. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*. 2009; 15:871-872.

Poccia F, Battistini L, Cipriani B, *et al*. Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. *J Infect Dis*. 1999; 180:858-861.

- Poccia F, Gougeon ML, Agrati C, *et al.* Innate T-cell immunity in HIV infection: the role of Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes. *Curr Mol Med.* 2002; 2:769-781.
- Promadej N, Costello C, Wernett MM, *et al.* Broad human immunodeficiency virus (HIV)-specific T cell responses to conserved HIV proteins in HIV-seronegative women highly exposed to a single HIV-infected partner. *J Infect Dis.* 2003; 187:1053-1063.
- Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, *et al.* Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med.* 2000; 342:921-929.
- Rallón NI, Naggie S, Benito JM, *et al.* Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS.* 2010; 24:23-29.
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, *et al.* Genetic variation in *IL28B* is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology.* 2010; 138:1338-1345.
- Ravet S, Scott-Algara D, Bonnet E, *et al.* Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood.* 2007; 109:4296-4305.
- Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Montagna M, Giaquinto C, De Rossi A. Role of beta-defensin-1 polymorphisms in mother-to-child transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009; 51:13-19.
- Riedel DJ, Sajadi MM, Armstrong CL, *et al.* Natural viral suppressors of HIV-1 have a unique capacity to maintain gammadelta T cells. *AIDS.* 2009; 23:1955-1964.
- Roe DL, Lewis RE, Cruse JM. Association of HLA-DQ and -DR alleles with protection from or infection with HIV-1. *Exp Mol Pathol.* 2000; 68:21-28.
- Saez-Cirion A, Versmisse P, Truong LX, *et al.* Persistent resistance to HIV-1 infection in CD4 T cells from exposed uninfected Vietnamese individuals is mediated by entry and post-entry blocks. *Retrovirology.* 2006; 3:81.
- Schenal M, Lo Caputo S, Fasano F, *et al.* Distinct patterns of HIV-specific memory T lymphocytes in HIV-exposed uninfected individuals and in HIV-infected patients. *AIDS.* 2005. 19:653-661.
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 1999; 283:857-860.
- Scott-Algara D, Truong LX, Versmisse P, *et al.* Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. *J Immunol.* 2003. 171:5663-5667.
- Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, *et al.* Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci.* 2004; 9:2388-2413.

- Selvaraj P, Swaminathan S, Alagarasu K, Raghavan S, Narendran G, Narayanan P. Association of human leukocyte antigen-A11 with resistance and B40 and DR2 with susceptibility to HIV-1 infection in south India. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006; 43:497-499.
- Sewram S, Singh R, Kormuth E, *et al*. Human TRIM5alpha expression levels and reduced susceptibility to HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2009; 199:1657-1663.
- Shankarkumar U, Pawar A, Ghosh K, Bajpai S, Pazare A. Human leucocyte antigen class II DRB1 and DQB1 associations in human immunodeficiency virus-infected patients of Mumbai, India. *Int J Immunogenet*. 2010; 37:199-204.
- Sheth PM, Kovacs C, Kemal KS, *et al*. Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy. *AIDS*. 2009; 23:2050-2054.
- Skurnick JH, Palumbo P, DeVico A, *et al*. Correlates of nontransmission in US women at high risk of human immunodeficiency virus type 1 infection through sexual exposure. *J Infect Dis*. 2002; 185:428-438.
- Strebel K, Luban J, Jeang KT. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med*. 2009; 7:48.
- Sullivan N, Sun Y, Sattentau Q, *et al*. CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *J Virol*. 1998; 72:4694-4703.
- Suresh P, Wanchu A, Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M. Spontaneous and antigen-induced chemokine production in exposed but uninfected partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007; 23:261-268.
- Suy A, Castro P, Nomdedeu M, *et al*. Immunological profile of heterosexual highly HIV-exposed uninfected individuals: predominant role of CD4 and CD8 T-cell activation. *J Infect Dis*. 2007; 196:1191-1201.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, *et al*. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009; 41:1105-1109.
- Tang J, Shao W, Yoo YJ, *et al*. Human leukocyte antigen class I genotypes in relation to heterosexual HIV type 1 transmission within discordant couples. *J Immunol*. 2008; 181:2626-2635.
- Thomas DL, Thio CL, Martin MP, *et al*. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009; 461:798-801.
- Thomson CW, Lee BPL, Zhang L. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol Res*. 2006; 35: 163-178.
- Tiemessen CT, Shalekoff S, Meddows-Taylor S, *et al*. Cutting Edge: Unusual NK cell responses to HIV-1 peptides are associated with protection against maternal-infant transmission of HIV-1. *J Immunol*. 2009.182:5914-5918.

- Tomescu C, Abdulhaqq S, Montaner LJ. Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN). *Clin Exp Immunol*. 2011; 164:158-169.
- Trabattoni D, Caputo SL, Maffeis G, *et al*. Human alpha defensin in HIV-exposed but uninfected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004; 35, 455-463.
- Tran HK, Chartier L, Troung LX, *et al*. Systemic immune activation in HIV-1-exposed uninfected Vietnamese intravascular drug users. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006; 22:255-261.
- Trkola A, Pomales AB, Yuan H, *et al*. Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol*. 1995; 69:6609-6617.
- Truong LX, Luong TT, Scott-Algara D, *et al*. CD4 cell and CD8 cell-mediated resistance to HIV-1 infection in exposed uninfected intravascular drug users in Vietnam. *AIDS*. 2003; 17:1425-1434.
- Urban TJ, Weintrob AC, Fellay J, *et al*. CCL3L1 and HIV/AIDS susceptibility. *Nat Med*. 2009; 15, 1110-1112.
- Vázquez-Pérez JA, Ormsby CE, Hernandez-Juan R, Torres KJ, Reyes-Teran G. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology*. 2009; 6:23.
- Vernazza P, Hirschel B, Bernasconi E, Flepp M, Les personnes séropositives ne souffrant d'aucune autre MST et suivant un traitement antirétroviral efficace ne transmettent pas le VIH par voie sexuelle. *Bulletin des Médecins Suisses*. 2008; 85:165-169.
- Wallace M, Bartz SR, Chang WL., Mackenzie DA, Pauza CD, Malkovsky M. Gamma delta T lymphocyte responses to HIV. *Clin Exp Immunol*. 1996; 103:177-184.
- Welzel TM, Gao X, Pfeiffer RM, *et al*. HLA-B Bw4 alleles and HIV-1 transmission in heterosexual couples. *AIDS*. 2007; 21:225-229.
- Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*. 2002; 23:291-296.
- Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*. 2006; 203:633-645.
- Young JM, Turpin JA, Musib R, Sharma OK. Outcomes of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases Workshop on understanding HIV-exposed but seronegative individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011; 27:737-743.
- Zapata W, Rodriguez B, Weber J, *et al*. Increased levels of human beta-defensins mRNA in sexually HIV-1 exposed but uninfected individuals. *Curr HIV Res*. 2008; 6:531-538.

Zinkernagel RM, LaMarre A, Ciurea A, *et al.* Neutralizing antiviral antibody responses. *Adv Immunol.* 2001; 79:1-53.

9. Publicaciones surgidas durante esta tesis

1. **Restrepo C**, Rallón NI, del Romero J, Rodríguez C, Hernando V, López M, Peris A, Lozano S, Sempere-Ortells JM, Soriano V, Benito JM. Low-level exposure to HIV induces virus-specific T cell responses and immune activation in exposed HIV-seronegative individuals. *J Immunol*. 2010; 185(2):982-9.
2. **Restrepo C**, Rallón NI, Carrillo J, Soriano V, Blanco J, Benito JM. Host factors involved in low susceptibility to HIV infection. *AIDS Rev*. 2011; 13(1):30-40.
3. **Restrepo C**, Carillo J, Rallón NI, Massanella M, del Romero J, Rodríguez C, Soriano V, Clotet B, Benito JM, Blanco J. Análisis of humoral response in HIV-exposed seronegative individuals. 2012 (enviado al *AIDS*).
4. **Restrepo C**, Rallón NI, Benito JM. Factores que influyen en la resistencia a la infección por el VIH. *Med Clin (Barc)*. 2011; 137(13):600-4.
5. **Restrepo C**, Rallón NI, del Romero J, Rodríguez C, Sempere-Ortells JM, Soriano V, Benito JM. HIV gag-specific immune response mediated by double negative (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) T cells in HIV-exposed seronegative individuals. 2012 (enviado al *J Med Virol*).
6. **Restrepo C**, Rallón NI, Vicario JL, del Romero J, Rodríguez C, Soriano V, Benito JM. Distribution of HLA alleles and KIR genotypes in a cohort of HIV-exposed seronegative individuals. 2012 (enviado al *Tissue Antigens*).
7. Rallón NI, **Restrepo C**, Naggie S, López M, Del Romero J, Goldstein D, McHutchison J, Soriano V, Benito JM. Interleukin-28B gene polymorphisms do not influence the susceptibility to HIV-infection or CD4 cell decline. *AIDS*. 2011; 25(2):269-71.
8. Rallón NI, Soriano V, **Restrepo C**, García-Samaniego J, Labarga P, López M, Peris A, González-Lahoz J, Benito JM. HCV-specific T-cell responses in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients on highly active antiretroviral therapy

are comparable to those observed in hepatitis C virus-monoinfected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011; 57(1):1-8.

9. Rallón NI, Soriano V, Naggie S, **Restrepo C**, McHutchison J, Vispo E, Benito JM. Impact of *IL28B* gene polymorphisms on interferon- λ 3 plasma levels during pegylated interferon- α /ribavirin therapy for chronic hepatitis C in patients coinfecting with HIV. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(5):1246-9.
10. Rallón NI, Soriano V, Naggie S, **Restrepo C**, Goldstein D, Vispo E, McHutchison J, Benito JM. *IL28B* gene polymorphisms and viral kinetics in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients treated with pegylated interferon and ribavirin. *AIDS*. 2011; 25(8):1025-33.
11. Peris-Pertusa A, López M, Rallón NI, **Restrepo C**, Soriano V, Benito JM. Evolution of the functional profile of HIV-specific CD8⁺ T cells in patients with different progression of HIV infection over 4 years. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010; 55(1):29-38.
12. Rallón NI, Naggie S, Benito JM, Medrano J, **Restrepo C**, Goldstein D, Shianna KV, Vispo E, Thompson A, McHutchison J, Soriano V. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients. *AIDS*. 2010; 24(8):F23-9.
13. Rallón NI, Pineda JA, Soriano V, Neukam K, Vispo E, Rivero A, Labarga P, Caruz A, **Restrepo C**, Camacho A, Barreiro P, Benito JM. Differences in Virological Response to Peginterferon- α Plus Ribavirin in HIV-Positive Patients Coinfecting With HCV Subtypes 1a or 1b. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012 ; 60(2):117-23.
14. López M, Peris A, Soriano V, Lozano S, Vicario JL, Rallón NI, **Restrepo C**, Benito JM. The expansion ability but not the quality of HIV-specific CD8(+) T cells is associated with protective human leucocyte antigen class I alleles in long-term non-progressors. *Immunology*. 2011; 134(3):305-13.

10. Abreviaturas

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ALT/GPT:	Alanina Aminotransferasa
APC:	<i>Antigen Presenting Cell</i> , célula presentadora de antígeno
APOBEC:	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic</i> , enzima citidin deaminasa
ARN:	Ácido Ribonucleico
ARNm:	Ácido Ribonucleico mensajero
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albúmina sérica bovina
CMSP:	Células Mononucleares de Sangre Periférica
DC:	<i>Dendritic Cell</i> , célula dendrítica
DC-SIGN:	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i> , molécula de adhesión intercelular 3 no integrina específica de células dendríticas
DMSO:	<i>Dimetil-Sulfoxide</i> , dimetil sulfóxido
ECD:	Phycoerythrin-Texas Red, Ficoeritrina-Rojo de Texas
EDTA:	<i>Etilen-Diamine-Tetraacetic Acid</i> , Ácido etilendiaminotetraacético
EHT:	Enfermedad Hepática Terminal
Fas:	Factor asociado a apoptosis
FasL:	Ligando del factor asociado a apoptosis
FITC:	<i>Fluorescein Isotiocianate</i> , Isotiocianato de fluoresceína
HESN:	<i>HIV-exposed seronegative</i> .
HLA:	<i>Human Leukocyte Associated Antigen</i> , antígeno leucocitario humano
HCC:	<i>Hepatocellular Carcinoma</i> , carcinoma hepatocelular
HCl:	Ácido Clorhídrico
IFN:	Interferón
IL:	Interleuquina
KIR:	<i>Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor</i>
MHC:	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , complejo mayor de histocompatibilidad
MIP:	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i> , proteína inflamatoria de macrófagos
NaOH:	Hidróxido de Sodio
Nef:	<i>negative factor</i> , factor negativo, proteína accesoria del VIH
NK:	<i>Natural Killer Cell</i> , células asesinas naturales
ORF:	<i>Open Reading Frame</i> , marco de lectura abierto

PBS:	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tampón fosfato salino
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
PE:	<i>Phycoerythrin</i> , ficoeritrina
PECY5:	<i>Phycoerythrin-Cyanine 5</i> , ficoeritrina-cianina 5
PECY7:	<i>Phycoerythrin-Cyanine 7</i> , ficoeritrina-cianina 7
PMA:	<i>Phorbol 12-Myristato 13-Acetato</i>
R10:	Medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SBF, 2% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 0.1% de gentamicina
RANTES:	<i>Regulated on Activation Normal T-Cells Expressed and Secreted</i>
RE:	Retículo Endoplásmico
RHV:	Región Hipervariable
RT-PCR:	Reverse Transcription <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa.
RVR:	Respuesta Viroológica Rápida
RVS:	Respuesta Viroológica Sostenida
RVFT:	Respuesta Viroológica al Final del Tratamiento
RVT:	Respuesta Viroológica Temprana
SBF:	Suero Bovino Fetal
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
SNP:	<i>Single nucleotide polymorphisms</i> , polimorfismos de un solo nucleótido
TARGA:	Terapia Antirretroviral de Gran Actividad
TCR:	<i>T Cell Receptor</i> , receptor de la célula T
TMB:	<i>Tetrametil-Benzidine</i> , tetrametil benzidina
TNF:	<i>Tumoral Necrosis Factor</i> , factor de necrosis tumoral
Th:	Linfocitos T helper o cooperadores
Treg:	Células T reguladoras
UTR:	<i>Untranslated Regions</i> , regiones no traducidas
UDI:	Usuarios de drogas intravenosas
Vif:	<i>Viral infectivity factor</i> , Factor de infectividad viral, proteína accesoria del VIH.
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia Humana
VPR:	<i>Viral protein R</i> , Proteína viral R, proteína accesoria del VIH
VPU:	<i>Viral protein U</i> , Proteína viral U, proteína accesoria del VIH
VHC:	Virus de la Hepatitis C